

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke



**RIG-I-like-Helikasen als Zielstrukturen für die Immuntherapie des hepatozellulären
Karzinoms mittels bifunktioneller siRNA gegen Polo-like-Kinase 1**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anja Nina Lena Funk
aus Ludwigsburg
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Max Schnurr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Hermeking

Prof. Dr. Hans-Joachim Stemmler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. biol. hum Peter Düwell

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Pathogenese des HCC	1
1.1.3 Therapieoptionen	2
1.1.4 Immuntherapie des HCC.....	3
1.2 Mustererkennungsrezeptoren.....	6
1.2.1 RIG-I- <i>like</i> -Helikasen.....	8
1.2.2 Typ I Interferone	12
1.2.3 RIG-I-Stimulation und Apoptose.....	12
1.3 Immunogener Zelltod	13
1.4 RNA-Interferenz und das Prinzip der bifunktionellen siRNA	14
1.5 Polo-<i>like</i>-Kinase 1 als Zielstruktur für die Tumorthherapie	16
1.5.1 PLK-1 und HCC	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3 Oligonukleotide und TLR-Liganden.....	19
2.1.4 Western-Blot-Antikörper	20
2.1.5 Zellkulturmaterialien.....	20
2.1.6 Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer	21
2.1.7 Technische Ausstattung	22
2.1.8 HCC-Zelllinien	23
2.1.9 Computerprogramme	23
2.2 Zellbiologische Methoden.....	23
2.2.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkulturen.....	23
2.2.2 Transfektion der HCC-Zellen	24
2.3 Funktionelle Analysen	24
2.3.1 Enzyme-linked immunosorbent assay	24

2.3.2 Durchflusszytometrische Zellanalyse	25
2.3.3 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	26
2.4 Molekularbiologische und -chemische Methoden.....	26
2.4.1 Proteinanalyse mittels Western Blot.....	26
2.4.2 In vitro-Transkription.....	27
2.4.3 Extraktion von RNA aus Tumorzellen	28
2.4.4 Reverse Transkription.....	28
2.4.5 Quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR)	29
2.5 Konfokalmikroskopie	30
2.6 Statistische Analyse.....	30
3. Ergebnisse.....	31
3.1 Evaluation von RIG-I als Zielstruktur für die Immuntherapie des HCC.....	31
3.1.1. Evaluation der RIG-I Expression in humanem Tumorgewebe.....	31
3.1.2 Expression von RIG-I in humanen und murinen HCC-Zelllinien	32
3.1.3 Überprüfung der Transduktion von HCC-Zellen mit fluoreszierender RNA	32
3.2 Charakterisierung der immunstimulatorischen Effekte von RLH-Liganden	34
3.2.1 Phosphorylierung von IRF3 wird durch RLH-Liganden induziert.....	34
3.2.2 RLH-Liganden induzieren dosisabhängig die Expression von Typ I Interferon in HCC-Zellen.....	35
3.2.3 RLH-Liganden induzieren die Produktion von CXCL10	36
3.2.4 RLH-Liganden induzieren die Expression von RLH über einen positiven feedback loop	37
3.3 Aktivierung des RLH-Signalweges löst in HCC-Zellen Zelltod aus	39
3.4 Kombination aus siRNA gegen Polo-like-Kinase 1 und RLH-Liganden	41
3.4.1 siRNA-vermittelte Expressionshemmung von PLK-1.....	41
3.4.2 PLK-1-Hemmung führt zu Zellzyklusarrest und Zelltod in HCC-Zellen.....	42
3.5 Kombination von RLH-Liganden und RNAi-vermittelter PLK-1-Inhibition	44
4. Diskussion	48
4.1 RLH als molekulare Zielstruktur einer Immuntherapie beim HCC.....	48
4.2 Expression von RIG-I in humanem HCC-Gewebe und HCC-Zelllinien.....	49
4.3 Immunstimulatorische Effekte nach RLH-Aktivierung	50
4.4 RLH-Liganden-vermittelte Induktion von Zelltod in HCC-Zellen	51

4.5 RNA-Interferenz als Therapiestrategie im HCC	52
4.6 Evaluation von PLK-1 als Zielstruktur für die RNAi	53
4.7 ppp-siRNA-Technologie	54
4.8 Immuntherapie des HCC	56
4.9 Limitation der Arbeit und klinische Relevanz	58
4.9.1 Limitation der Arbeit	58
4.9.2 Klinische Relevanz	59
5. Zusammenfassung	61
6. Literaturverzeichnis	62
7. Verzeichnis der Abkürzungen	73
8. Danksagung	76

1. Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC), der fünft häufigste Tumor weltweit, ist eine aggressive Krebserkrankung, die mit einer 3-Jahresüberlebensrate von 10% eine sehr schlechte Prognose für die betroffenen Patienten aufweist.¹ Die Inzidenz des HCC hat über die letzten zwei Jahrzehnte in Europa und den USA deutlich zugenommen und wird aufgrund der steigenden Zahl von Hepatitis B (HBV) und C (HCV) Infektionen auch in Zukunft weiterhin ansteigen.² Das HCC entsteht in der Regel auf dem Boden einer chronischen Lebererkrankung und ist eine häufige Todesursache bei Patienten mit Leberzirrhose.³

In 50% der Fälle entwickelt sich das HCC durch eine chronische Infektion mit Hepatitis B. Die Inzidenz steigt mit Viruslast und Dauer der Infektion. Dieses Risiko kann durch eine Impfung gegen HBV gesenkt werden. Weitere Risikofaktoren des HCC sind Infektionen mit HCV, die Autoimmunhepatitis, Umweltfaktoren wie Aflatoxin B1 und die Alkohol-assoziierte Leberzirrhose. Die Nicht-Alkohol-induzierte Fettleberhepatitis wurde ebenfalls als Risikofaktor beschrieben.⁴ Das HCC tritt bei Männern dreimal häufiger auf als bei Frauen.⁵

Die hohe Mortalität des HCC ist durch verschiedene Faktoren bedingt. Eine Ursache ist die hohe Prävalenz in Südostasien und Zentralafrika, wo oft keine optimale medizinische Versorgung existiert.⁶ In Industrieländern trägt die oft erst späte Diagnosestellung zur hohen Mortalität bei.⁵

1.1.2 Pathogenese des HCC

Das HCC steht in enger Beziehung zu den Hepatozyten. Geklärt ist aber nicht, ob ausdifferenzierte Hepatozyten letztlich die Ursprungszellen des HCC sind.⁷ Das HCC ist ein molekular komplexer Tumor, der auf dem Boden chronischer Lebererkrankungen, vor allem der Leberzirrhose, entsteht. Demzufolge führen zum einen die dabei entstehenden chronischen Zellschädigungen zu DNA-Schäden.⁸ Zum anderen treten aber auch klassische Tumoralterationen des Genoms auf, wie Deletionen und Amplifikationen größerer

chromosomaler Abschnitte, die zu einer veränderten Expression zahlreicher Gene führen.^{9, 10, 11} Diese Veränderungen sind Ausdruck einer chromosomalen Instabilität, die unter anderem durch Abwandlungen der Mitose¹² und durch Schädigungen der DNA durch Abbauprodukte von Ethanol oder durch die Replikation des HCV entstehen können.^{13, 14} Außerdem können beim HCC mehrere Signalwege verändert sein, die das Wachstum und die Proliferation der Leberzellen steuern.¹⁵

Neben molekularen Mechanismen tragen auch immunologische Reaktionen zur Entstehung des HCC bei. Viele chronische Leberkrankheiten führen zu einer chronischen Aktivierung des Immunsystems.¹⁶ So können beispielsweise chronische Entzündungen zu einer Aktivierung von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) in Kupferzellen führen. Diese produzieren verschiedene Zytokine und Chemokine, unter anderem IL-6, dem eine wichtige Rolle in der HCC-Entstehung zugeschrieben wird.¹⁷ IL-6 wiederum aktiviert *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), das eine wichtige Aufgabe im Überleben von transformierten Zellen spielt.¹⁸ Das HCC entfaltet sich in einer vom Immunsystem geformten Umgebung. Demzufolge ist bereits während der Karzinogenese eine fortwährende Anpassung an diese Umgebung notwendig, um eine Eliminierung durch das Immunsystem zu vermeiden. Dieser Prozess wird als *Immunoediting* beschrieben. Er führt dazu, dass Tumore klinisch progressiv sind, die der Kontrolle durch das Immunsystem entgehen.¹⁹

1.1.3 Therapieoptionen

Therapieoptionen des HCC sind die Lebertransplantation, die Lebersegmentresektion und die Radiofrequenzablation (RFA bzw. RFTA), die transarterielle Chemoembolisation (TACE), sowie die molekulargerichtete Therapie mit dem Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib.²⁰ Diesen Therapiestrategien sind allerdings Grenzen gesetzt: Das HCC ist relativ resistent gegenüber Chemotherapien. Nur 20% der Patienten kommen für eine Lebertransplantation in Frage. Die meisten Tumore werden erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt, so dass eine kurative Therapie nicht in Frage kommt.²¹ Der Kinase-Inhibitor Sorafenib ist derzeit die einzige systemische Therapie, die das Überleben der Patienten mit fortgeschrittenem HCC um 2,3 bis 2,8 Monate verlängert und als Standardtherapie für diese Patienten verwendet wird.²² Alles in allem liegt die mediane Überlebensrate für Patienten mit fortgeschrittenem, nicht-resektablem HCC unter einem Jahr.²³ In den letzten Jahren erbrachten die meisten klinischen Phase II und

III Studien mit neuen Substanzen negative Ergebnisse. Die Entwicklung effektiver Therapieoptionen ist daher dringend erforderlich.²⁴

1.1.4 Immuntherapie des HCC

Die chronische Entzündung durch HBV oder HCV stellt einen Hauptrisikofaktor für das HCC dar, was den Tumor möglicherweise zum geeigneten Zielobjekt einer Immuntherapie macht. In den letzten Jahren wurden verschiedene immunologische Therapiestrategien entwickelt und in klinischen Studien getestet. Rekombinantes humanes IFN- α war die erste Immuntherapie, die in klinischen Studien untersucht wurde, basierend auf seiner immunstimulatorischen und anti-angiogenetischen Wirkung und der weitgehenden Erfahrung in der Behandlung der chronischen Virushepatitis. Leider konnten die Studien von Llovet et al. und Chen et al. nach IFN- α Therapie kein signifikant verbessertes Überleben bei den behandelten Patienten nachweisen, weder nach alleiniger noch nach adjuvanter Therapie nach Leberresektion.^{25, 26}

Die Vakzinierung ist ein weiteres Therapieverfahren, das mehrfach in klinischen Studien untersucht wurde. Bei der Vakzinierung werden Tumorantigene eingesetzt, die eine durch T-Zellen vermittelte antigenspezifische Immunreaktion einleiten. Es werden ganze Proteine, Peptidfragmente, kodierende DNA oder RNA als Tumorantigene verwendet, die gegen den Tumor gerichtete T-Zellantworten auslösen sollen.²⁷ Mögliche Zielstrukturen sind das AFP, das *carcinoembryonic antigen glypican-3* (GPC3)²⁸ oder individuelle RNA, die für Neo-Epitope kodieren. Diese Vakzine waren bisher jedoch in der Tumorbehandlung wenig effektiv und wiesen teilweise erhebliche Nebenwirkungen auf.²⁷

Drei wissenschaftliche Fortschritte haben das Gebiet der Tumormmuntherapie über die letzten Jahre maßgeblich verändert. Zum einen gibt es ein besseres Verständnis über die Tumorbilogie, zum anderen wurden Immun-*Checkpoint*-Moleküle als bestimmende Faktoren entdeckt, die das Immunsystem unterdrücken.²⁹ Die Fortschritte in der Sequenzierungstechnologie ermöglichen schnelle und zu erschwinglichen Kosten generierbare Analysen von Tumor-Genomen und die Charakterisierung bestimmter Mutationen in individuellen Tumoren. Die klinische Anwendung der Gentherapie ermöglicht die genetische Modifikation von transferierten Zellen *ex vivo* oder die *in vivo* Weitergabe von Genen mit Hilfe von Vektoren, die Immunantworten reaktivieren.³⁰

Auch der adoptive T-Zelltransfer (ACT) wird beim HCC erforscht. Dabei werden aus Patientenblut oder Tumoren T-Zellen isoliert, expandiert, manipuliert und den Patienten wieder zugeführt. Beim HCC wird der ACT vor allem als adjuvante Therapie untersucht.³¹ In einer randomisierten klinischen Studie von Takayama et al., erhielten Patienten nach kurativer Leberresektion autologe, aktivierte Lymphozyteninfusionen. Es konnte eine Verlängerung des Rezidiv-freien Intervalls beobachtet werden, jedoch kein signifikant verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zur Kontrollgruppe.³² In einer neueren Studie wurden HCC-Patienten nach kurativer Resektion mit einer Kombination aus autologer dendritischer Zell-Vakzinierung und aktivierten T-Zellen behandelt. Verglichen mit der Kontrollgruppe, die nur operiert wurde, zeigte sich in der mit der Kombinationstherapie behandelten Gruppe ein beeindruckendes Gesamtüberleben von 97,7 vs. 41,0 Monaten.³³ Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Kombination unterschiedlicher Therapieverfahren ein vielversprechender Ansatz in der HCC-Therapie ist.

Eine weitere Art der Tumorimmuntherapie ist die antikörperbasierte Immuntherapie. Hierbei werden monoklonale Antikörper eingesetzt, die entweder inhibitorische Rezeptor-Ligand-Interaktionen hemmen (sog. *Checkpoint*-Inhibitoren) oder selbst Agonisten von kostimulatorischen Rezeptoren auf Immunzellen sind. Einer der Checkpoint-Inhibitoren ist der humane IgG2 Antikörper Tremelimumab, der *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4* (CTLA-4), einen inhibitorischen Rezeptor auf T-Zellen, blockiert. Eine kleine klinische Studie beobachtete vielversprechende Effekte einer Therapie mit Tremelimumab bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC und chronischer HCV Infektion. Neben einer antitumoralen Wirkung zeigte sich auch ein antiviraler Effekt.³⁴ Als weiteres Beispiel sei der monoklonale IgG4 Antikörper Nivolumab genannt, der den *programmed cell death-1* (PD-1) Rezeptor auf aktivierten T-Zellen inhibiert. Auch für Nivolumab zeigten Phase I/II Studien erste Erfolge bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC.³⁵

Die Gentherapie basiert darauf, dass genetisches Material (Transgene) in Zellen gebracht wird, um deren vorhandenes Genexpressionsmuster zu ändern. Dieses genetische Material kann aus natürlichen oder künstlichen Genen bestehen, die natürliche, chimere Proteine oder subgenomische Sequenzen kodieren und so die Expressionsmuster endogener Gene beeinflussen. Die meisten Vektoren in der Gentherapie sind viralen Ursprungs. Für die Immuntherapie des HCC wurden in klinischen Studien zwei verschiedene virale Agenzien getestet. Zum einen wurden wiederholte Injektionen eines nicht-replikationsfähigen

Adenovirus untersucht, der humanes IL-12 kodiert.²⁷ Es konnte eine Zunahme an T-Zellen im Tumorgewebe beobachtet werden, sowie eine objektive Tumorremission bei einem von zehn Patienten. In einer anderen Studie wurde ein onkolytischer Pockenvirus eingesetzt, der das Gen für humanes GM-CSF trägt. Onkolytische Viren sind modifizierte Viren, die sich selektiv in Krebszellen replizieren und die in diesen zu Tumorzelllyse führen. Die Tumorselektivität der Viren ist entweder intrinsisch oder kann durch die Manipulation an bestimmten Genen erzeugt werden. Die sterbenden Krebszellen setzen Tumorantigene frei, die von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und prozessiert werden. Diese aktivieren eine adaptive antitumoröse Immunantwort. Dies kann dadurch verstärkt werden, indem die onkolytischen Viren mit Genen ausgestattet werden, die Zytokine wie GM-CSF exprimieren. In einer HCC-Studie mit onkolytischen Viren ließ sich eine Tumorkontrollrate von 48 % nach 8-wöchiger Behandlung erzielen.³⁶

Durch die Erforschung dieser Immuntherapeutika haben sich neue Therapiemöglichkeiten für das HCC aufgetan. Es ist denkbar, die verschiedenen Immuntherapeutika miteinander zu kombinieren, um synergistische Effekte zu erzielen. Vor allem die Kombination mit Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren verspricht die größten Erfolge. Auch Kombinationen aus Immuntherapeutika und klassischen Therapieverfahren, wie der TACE oder RFA, sind denkbar.^{31, 37} Aktuell werden viele Studien durchgeführt, die eine große Bandbreite der unterschiedlichen Immuntherapiemöglichkeiten beim HCC erforschen.³¹

Die Studie von Jin Hou et al. schlägt die zytosolische Helikase *retinoic acid-inducible gene I* (RIG-I), ein Rezeptor für virale RNA, als potentiellen Biomarker im HCC vor. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass die Expression von RIG-I in HCC herunterreguliert ist und Patienten mit verminderter RIG-I-Expression ein kürzeres Überleben und schlechteres Ansprechen auf die Therapie mit IFN- α aufweisen.³⁸ Einen Überblick über die verschiedenen lokalen und immunologischen Therapieoptionen gibt Abbildung 1.

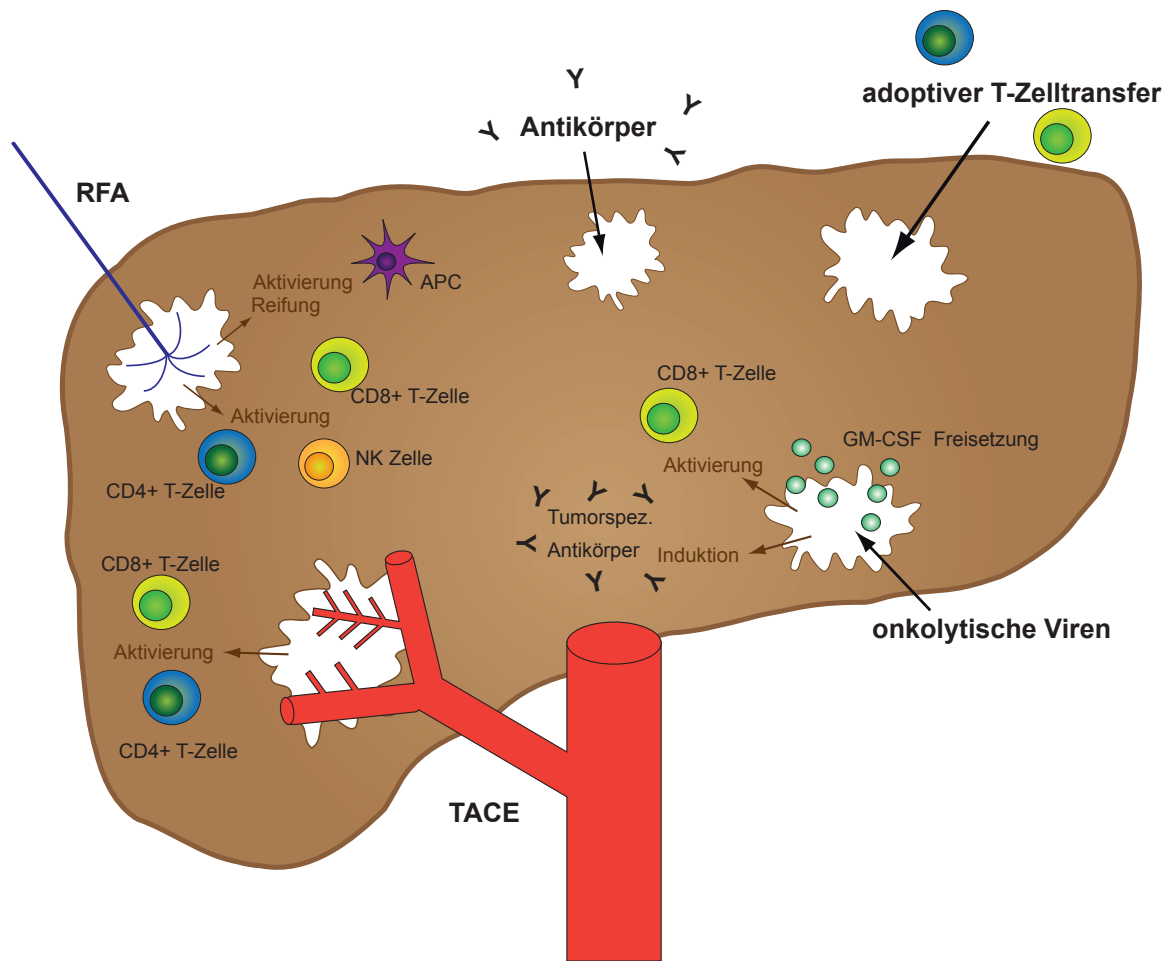


Abbildung 1: Das Immunsystem-aktivierende Therapieoptionen beim HCC. Dargestellt sind verschiedene ablative Therapieverfahren des HCC wie RFA, die Therapie mit Antikörpern oder onkolytischen Viren, ACT oder TACE und deren Effekt auf $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen, dendritische Zellen, NK Zellen und die Bildung von Antikörpern. (modifiziert nach Korangy F. et al. 2013)

1.2 Mustererkennungsrezeptoren

Ein Teil des angeborenen Immunsystems sind die sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern-recognition-Rezeptoren*, PRR), welche die initiale Antwort auf eine Infektion oder Gewebeschädigung auslösen. PRR sind Proteine, die von Zellen des angeborenen Immunsystems, aber auch in anderen Geweben, exprimiert werden. Sie befinden sich entweder frei löslich im Blut, oder sind membrangebunden an der Zelloberfläche bzw. in Endosomen oder im Zytosol lokalisiert. PRR erkennen bestimmte Strukturen von Mikroorganismen, die *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). Des Weiteren sind sie dazu fähig, endogene Moleküle von geschädigten Zellen zu erkennen. Diese werden *damage-associated molecular patterns* (DAMP) genannt. Das Binden eines PAMP oder DAMP an seinen zugehörigen PRR führt je nach Rezeptor zur Endozytose, zum Abbau durch

Phagozyten und setzt eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang, welche schließlich die Aktivierung des Immunsystems und die Sezernierung bestimmter Signalstoffe zur Folge hat. Diese Aktivierung endet in der transkriptionellen Hochregulation von Genen, die in der Entzündungskaskade eine Rolle spielen. Diese Gene kodieren pro-inflammatorische Zytokine, wie Typ I Interferon (IFN), Chemokine, antimikrobielle Proteine, sowie Proteine, die an der Modulation der PRR beteiligt sind.³⁹ Es sind vier verschiedene Klassen der PRR-Familie bekannt: Zum einen gibt es die membranständigen Toll-like-Rezeptoren (TLR) und *C-type Lektin*-Rezeptoren (CLR), zum anderen die zytoplasmatischen Proteine der Familie der NOD-like-Rezeptoren (NLR) und RIG-I-like-Rezeptoren (RLR).⁴⁰

TLR ist eine der am besten charakterisierten PRR-Familien. Sie sind durch mehrfache Kopien eines leucinhaltigen Sequenzmotivs am N-terminalen Ende und durch eine transmembrane Region charakterisiert, an die eine Toll-/IL-1R homologe (TIR) Domäne gehängt ist, die ins Zytoplasma ragt.⁴¹ Im Menschen wurden zehn TLRs identifiziert. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sind auf Zelloberflächen, vorwiegend von Immunzellen, lokalisiert und erkennen molekulare Muster von Bakterien.⁴² TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind in der Membran von Endosomen lokalisiert, wo sie Nukleinsäuren von Viren erkennen.⁴¹ Die Aktivierung der TLR führt zur Aktivierung von NF- κ B und *mitogen-activated protein kinases* (MAP-Kinasen), welche die Expression von Immungenen regulieren und zur Bildung von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-6 führen. TLR, die virale PAMP erkennen, aktivieren Transkriptionsfaktoren der *interferon regulatory factor* Familie (IRF), die die Expression von Typ I IFN und Entzündungsgenen veranlassen.⁴³

CLR erkennen bestimmte Kohlenhydratverbindungen von Bakterien, Pilzen oder Viren und stimulieren entweder die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen oder hemmen TLR-vermittelte Immunkomplexe.⁴⁴

Die Familie der NOD-like-Rezeptoren besteht beim Menschen aus 22 verschiedenen intrazellulären Mustererkennungssensoren. Am besten charakterisiert sind die Rezeptoren NOD1 und NOD2, die Peptidoglykane von Bakterien erkennen.⁴⁵ Nach Bindung kommt es zur Aktivierung von MAP-Kinasen und NF- κ B, wodurch vermehrt Entzündungsmediatoren wie TNF- α und IL-6 gebildet werden. NALP3 gehört ebenfalls zu den NOD-like-Rezeptoren. NALP3 reagiert auf verschiedene Stimuli durch Bildung eines Komplexes, dem sogenannten NALP3 Inflammasom, das die Ausschüttung von Zytokinen der IL-1-Familie fördert.⁴⁶

Im Folgenden werden die zum Verständnis der vorliegenden Arbeit erforderlichen RIG-I-like-Helikasen (RLH) näher erläutert. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der diversen Mustererkennungsrezeptoren.

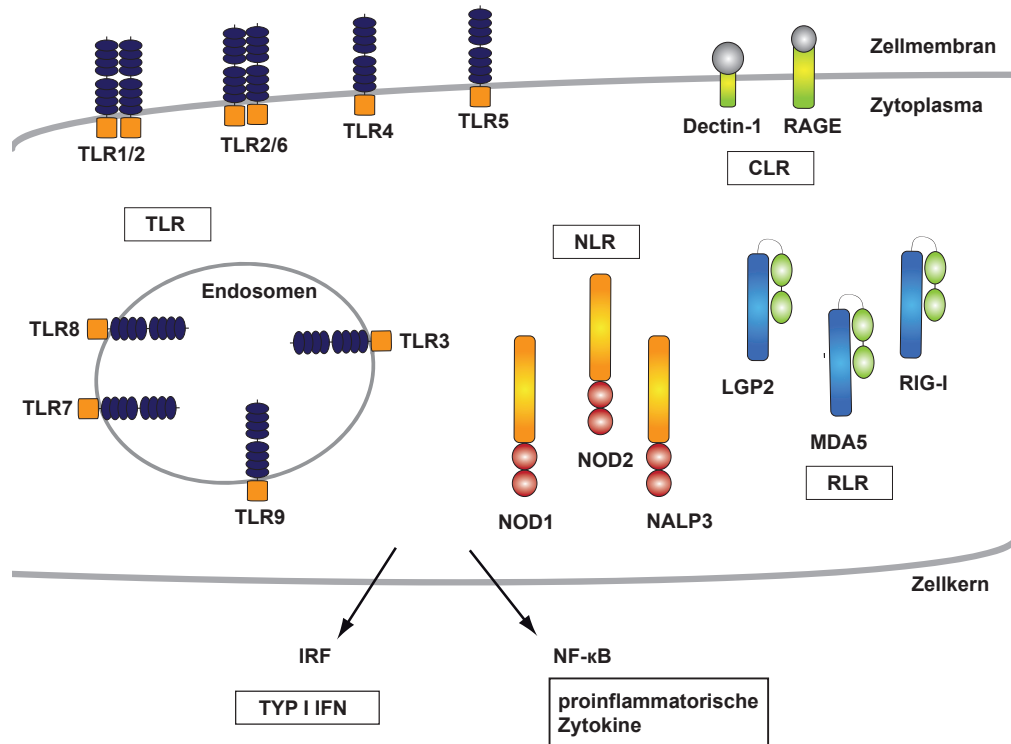


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mustererkennungsrezeptoren (PRR). TLR sind membrangebunden an der Zelloberfläche oder an Endosomen, wo sie bakterielle Proteine oder virale Nukleotide erkennen. NLR und RLR liegen im Zytoplasma und binden bakterielle Strukturen, sowie virale RNA. CLR befinden sich ebenfalls an der Zelloberfläche und erkennen Bestandteile von Pilzen, Bakterien oder Viren. Alle PRR aktivieren Signalwege über NF- κ B und IRF, was zur Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine und Typ I IFN führt. (modifiziert nach Cardell et al. 2012)

1.2.1 RIG-I-like-Helikasen

Verglichen mit den membrangebundenen TLR, die oft nur von bestimmten Zelltypen des Immunsystems exprimiert werden, kommen die RLH im Zytosol fast aller kernhaltigen Zellen vor. Ihre primäre Aufgabe ist die Erkennung von viraler RNA-Spezies im Zytosol, um eine antivirale, Typ-I-IFN-vermittelte Immunantwort auszulösen. Dies führt unter anderem zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems, Hemmung der viralen Replikation und nach Überschreitung einer gewissen Schwelle zum Zelltod der infizierten Zelle.⁴⁰ Zu den RLH gehören die drei Vertreter *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2).^{47, 48, 49}

1.2.1.1 RIG-I

RIG-I wurde ursprünglich als induziertes Gen in mit Retinoinsäure-behandelten akuten promyeloischen Leukämiezellen entdeckt. Erst die spätere Identifikation eines RIG-I homologen Gens, das sich durch das *porcine reproductive and respiratory syndrome* Virus (PRRSV) aktivieren ließ, deutete auf eine Verbindung zwischen RIG-I und Virusinfektion hin.

RIG-I wird durch spezifische virale RNA von Paramyxoviridae, wie *Newcastle disease virus* und Sendai Virus, Vesikulärem Stomatitis Virus, Influenza A Virus und Japanischem Enzephalitis-Virus, aktiviert. RIG-I erkennt relativ kurze doppelsträngige RNA (bis zu 1kb). Ausschlaggebend für die Erkennung ist eine bestimmte RNA Struktur mit einem 5'-Triphosphat Ende.^{50, 51} Hierbei sei die Differenzierung zwischen „Selbst“- und „Fremd“-RNA zu bemerken, da eigene RNA im Zytoplasma nicht mit einer freien Triphosphat-Einheit vorkommt. Eigene RNA wird entweder durch 5'-*Capping* (modifiziertes Guanosin) oder durch RNA-Nukleosidmodifikationen geschützt.^{50, 51, 52} Als synthetische Liganden für RIG-I dienen 5'ppp-modifizierte RNA-Moleküle, die sowohl für zellbiologische Studien als auch für therapeutische Zwecke entwickelt werden.⁵³

RIG-I hat zwei charakteristische *caspase-recruitment*-Domänen (CARD), eine Helikasen Domäne sowie eine C-terminale Domäne (CTD), die als Repressor-Domäne (RD) mit der CARD- und Helikasen Domäne interagieren kann (Abbildung 3). CARD kann als konstitutiver Aktivator die IFN-Produktion aktivieren, ohne dass dafür eine virale Infektion vorliegt. Die C-terminale Repressor-Domäne (CRD) und Helikasen Domäne sind für die Bindung der viralen RNA zuständig und somit von essentieller Bedeutung.^{54, 55} Die CARD-Domäne dient der Signalweiterleitung über CARD-CARD-Interaktionen mit Adaptermolekülen. In ruhenden Zellen liegt RIG-I als inaktives Monomer vor. Virusinfektionen und die Bindung von RNA lösen eine Konformationsänderung des Moleküls hervor, die eine Interaktion mit Adaptermolekülen ermöglicht.⁵⁶

1.2.1.2 MDA5

MDA5 erkennt sehr lange doppelsträngige RNA (>1 kb) von Picornaviren, wie Enzephalomyokarditis-Viren (EMCV), Mengo und Theiler's Viren.⁴⁷ Poly(I:C) ist ein synthetisch hergestellter Ligand von MDA5.⁵⁷ Wie RIG-I besitzt es eine Helikasen Domäne und zwei N-terminale CARD-Domänen.

1.2.1.3 LGP2

LGP2, das dritte Mitglied der RLH-Familie, hat keine CARD-Domäne und somit selbst keine Signalfunktion. Es moduliert die Funktion von RIG-I und MDA5.^{40, 58} Durch eine Überexpression von LGP2 wurde dargestellt, dass LGP2 zu einer Hemmung der IRF- und NF- κ B-abhängigen Signalwege führt und als negativer Feedback-Regulator einer RIG-I-vermittelten Immunantwort agiert.⁴⁹ Eine andere Arbeit zeigte wiederum, dass LGP2 durch seine ATPase-Aktivität für die erfolgreiche Auslösung einer Immunantwort sowohl über RIG-I, als auch über MDA5 wichtig sein kann.⁵⁹ Aus diesem Grund kann man annehmen, dass LGP2 sowohl inhibierend, als auch aktivierend die Funktion von RIG-I und MDA5 beeinflusst.

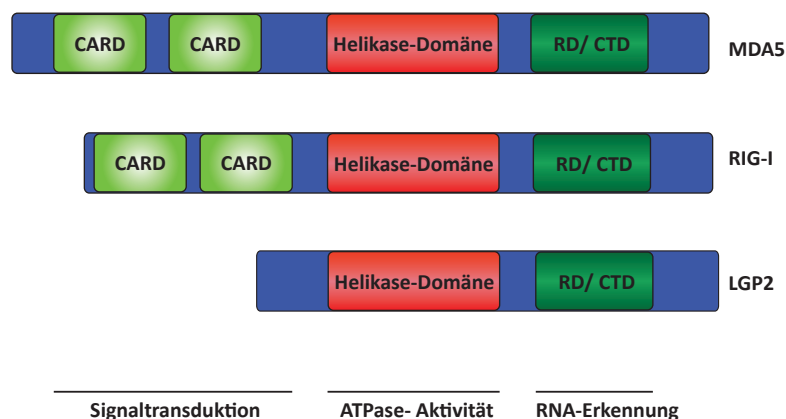


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Komponenten von MDA5, RIG-I und LGP2. MDA5 und RIG-I bestehen aus zwei charakteristischen *caspase-recruitment*-Domänen (CARD), einer Helikasen-Domäne sowie einer C-terminalen Domäne (CTD), die als Repressor-Domäne (RD) mit der CARD- und Helikasen-Domäne interagieren kann. LGP2 ist ebenfalls eine Helikase, besitzt jedoch keine CARD-Domäne und hat somit selbst keine Signalfunktion.

1.2.1.4 Der RLR-Signalweg

Als Adaptermolekül von RIG-I wurde im Jahr 2005, das in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierte Protein IFN- β promoter stimulator 1 (IPS-1), gleichzeitig von vier unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben und ist daher auch unter den Namen MAVS, VISA und Cardif bekannt.⁵⁶ IPS-1 enthält eine N-terminale CARD-ähnliche Domäne, die für die Interaktion mit den RLR verantwortlich ist. Die transmembrane Domäne am C-terminalen Ende ist für die Weiterleitung der antiviralen Antwort und die mitochondriale Zielsteuerung zuständig.⁶⁰ Nach der Bindung an das Adapterprotein IPS-1 führt die Signalkaskade über Mitglieder der Familie des tumor necrosis factor (TNF) Rezeptor assoziierter Faktors (TRAF) und die Kinasen TBK1 und IKK ϵ zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7. Darüber hinaus wird der pro-inflammatorische NF- κ B-Signalweg in Gang gesetzt.^{56, 61} Es resultiert die Synthese von Typ I IFN (IFN- α , IFN- β) sowie anderer proinflammatorischer Proteine, wie beispielsweise CXCL10.^{62, 63, 64} Eine weitere Konsequenz des RLR-Signalweges ist die funktionelle Hemmung regulatorischer T-Zellen.⁶⁵ Abbildung 4 verdeutlicht die RIG-I-Signalkaskade nach Aktivierung durch synthetische 5'ppp-RNA.

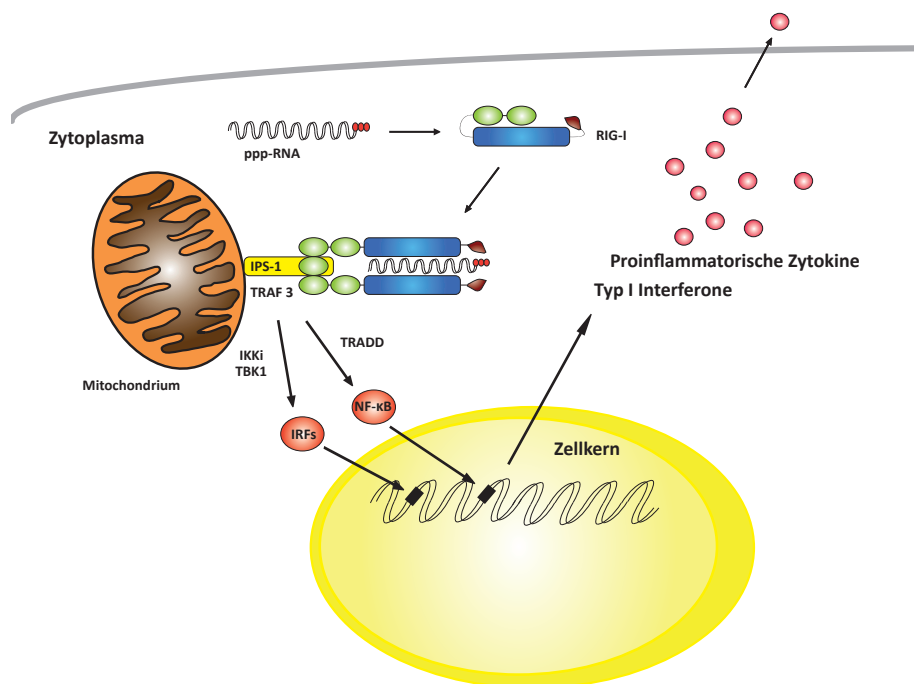


Abbildung 4: Immunstimulatorische Antwort nach Aktivierung von RIG-I durch 5'ppp-RNA. RIG-I erkennt die eingeschleuste RNA an ihrer 5'Triphosphat-Modifikation und bindet über die CARD-Domäne an IPS-1, wodurch es zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges und der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 kommt, was die Bildung von Typ I IFN induziert. (modifiziert nach Takeuchi und Akira, 2010)

1.2.2 Typ I Interferone

Interferone waren die ersten Zytokine, die 1957 von Isaacs und Lindenmann entdeckt wurden und erhielten ihren Namen, da sie in der Lage sind, direkt in die intrazelluläre Virusreplikation einzugreifen (*interfere*) und diese zu unterbinden.⁶⁶ Anschließend ergaben Untersuchungen, dass das Typ I IFN System aus mindestens 13 unterschiedlichen IFN- α Subtypen, einem IFN- β sowie weiteren, IFN- ϵ , IFN- κ und IFN- ω besteht. Die IFN der α -Familie können von vielen Zellen gebildet werden. IFN- β wird vorwiegend von infizierten Fibroblasten als Antwort auf die Erkennung viraler Nukleinsäuren gebildet. IFN aktivieren umliegende virusinfizierte sowie nicht-infizierte Zellen. In diesen werden daraufhin Proteine gebildet, welche einerseits eine weitere (Virus-) Proteinsynthese in den betroffenen Zellen hemmen und andererseits den Abbau von viraler und zellulärer RNA bewirken.

Die gebildeten IFN vermitteln ein sekundäres Signal über die Interaktion mit dem heterodimeren IFN-Rezeptor (IFNR), der in den meisten Zellen exprimiert wird. Die Interaktion zwischen IFN und IFNR aktiviert den Janus Kinase (*JAK*)-*signal transducer activator of transcription* (STAT) Signalweg (JAK-STAT-Signalweg), der zu einer antiviralen Antwort führt. Aktivierte STAT-Proteine dimerisieren, translozieren in den Zellkern und aktivieren die Genexpression von IFN-stimulierten Genen (ISG), indem sie an bestimmte Erkennungssequenzen dieser Gene binden. Vermehrt werden MHC-Klasse-I-Moleküle gebildet, welche virusinfizierte Zellen für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen leichter angreifbar machen. Die Aktivierung von IFN führt darüber hinaus zur Bildung unterschiedlicher Botenstoffe des angeborenen Immunsystems, wie IL-2, TNF- α oder dem Chemokin CXCL10. Es konnte gezeigt werden, dass IFN an der Reifung von dendritischen Zellen und der Aktivierung von NK-Zellen beteiligt sind.^{67, 68, 69}

1.2.3 RIG-I-Stimulation und Apoptose

Zusätzlich wurde demonstriert, dass die Aktivierung von RLH in Zellen Apoptose auslöst. Dieses Wissen ist besonders hilfreich, um RLH-Liganden für die Krebstherapie zu nutzen. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei der RIG-I- und MDA5-vermittelten Apoptose über den intrinsischen Signalweg, die *BH3-only* Proteine Noxa und Puma hochreguliert werden. Die Arbeit von Besch et al. identifizierte einen Signalweg, in dem durch die Aktivierung von Noxa durch MDA5 oder RIG-I in Melanomzellen Apoptose ausgelöst wird. Sie konnten

beobachten, dass transformierte Zellen viel sensibler auf die Apoptoseinduktion reagieren als nicht-entartete Hautzellen und identifizierten das anti-apoptotische Molekül Bcl-x_L als Schutzfaktor.^{70, 71} Die Studie zeigt die Wirksamkeit der RLH-Aktivierung im Melanommodell, bei dem humane Melanomzellen in immundefiziente Mäuse gebracht wurden. In einer Arbeit von Poeck et al. wurde das Konzept der modifizierten 5'ppp-RNA zusätzlich mit der Genexpressionshemmung mittels RNA-Interferenz verbunden (sog. bifunktionelle ppp-RNA-Moleküle). Melanomzellen wurden mit einer *in vitro* transkribierten 5'ppp-modifizierten *small interfering* RNA (siRNA) behandelt, die das antiapoptotische Protein *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) auszuschalten vermag und zudem RIG-I aktiviert. Durch eine additiv gesteigerte Apoptoserate der Tumorzellen zeigte sich ein positiver Therapieeffekt.⁷² Bisher ist jedoch über die Expression von RIG-I in anderen Krebszellen wenig bekannt und auch das optimale Zielgen für die siRNA-vermittelte Hemmung der Genexpression muss noch gefunden werden.⁷³

Die Erkenntnisse über die RLH und ihre entsprechenden Liganden öffnen nicht nur Türen in der Entwicklung neuer Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten, sondern liefern auch neue Ansatzmöglichkeiten in der Tumorthherapie. Aufgrund seiner immunstimulatorischen und pro-apoptotischen Aktivität könnte RIG-I eine neue Zielstruktur für die Therapie des HCC darstellen.

1.3 Immunogener Zelltod

Das Immunsystem ist in der Lage, zwischen physiologischem (nicht-immunogenem) Zelltod und pathologisch vermitteltem Zelltod, dem immunogenen Zelltod, zu unterscheiden. Der immunogene Zelltod wird charakterisiert durch eine Änderung in der Zusammensetzung der Plasmamembran (einschließlich der Exposition von Calreticulin und Hitzeschockproteinen) sowie durch eine Änderung des Mikroenvironment, verursacht durch die Freisetzung von ATP und HMGB1.⁷⁴ Die Untersuchung des immunogenen Zelltods ist in der Krebstherapie von Bedeutung. Es konnte beobachtet werden, dass eine vermehrte Lymphozyteninfiltration im Tumorgewebe nach Chemotherapie mit einem höheren Therapieerfolg verbunden ist.^{75, 76} Zellen, die dem immunogenen Zelltod *in vitro* erliegen, können als autologe Vakzine dienen, um protektive anti-tumorale Immunantworten *in vivo* hervorzurufen. Tumor-Therapeutika, die einen immunogenen Zelltod verursachen, verlieren ihre Wirkung, wenn die Zelltodsignale durch die Tumorzellen unterdrückt werden, wenn die Wahrnehmung dieser Signale behindert

wird oder wichtige Immunzellen, wie CD8⁺ T-Zellen fehlen.⁷⁴

1.4 RNA-Interferenz und das Prinzip der bifunktionellen siRNA

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlicher Zellmechanismus, bei dem kurze RNA (20–30 Nukleotide) die Expression bestimmter Zielgene stilllegen. Dieser Vorgang wird als *gene silencing* bezeichnet. Die RNA-Interferenz ist unter anderem ein Schutzmechanismus der Zelle gegen “zellfremde” RNA, z.B. virale RNA. RNAi hat in den letzten Jahren ein hohes Maß an wissenschaftlicher Aufmerksamkeit erlangt. Sie ist nicht nur hilfreich, um die Funktion einzelner Gene zu erforschen, sondern kann auch in der Krebstherapie für die Blockade Krebs-vermittelnder Gene angewandt werden. Der Vorteil von RNAi ist, dass theoretisch für jedes Gen eine siRNA entworfen werden kann. Bei der RNAi-Technologie wird eine doppelsträngige RNA (dsRNA) in die Zelle eingeschleust. In der Zelle wird durch die Ribonuklease *Dicer* aus der dsRNA die so genannte *small interfering RNA* (siRNA) erstellt.⁷⁷ Die erstellte siRNA bildet mit anderen Enzymen den Kern des *RNA-induced silencing complex* (RISC).^{78, 79}

Der Komplex mit der aufgenommenen siRNA kann zielgerichtet an die komplementäre *messenger RNA* (mRNA) des auszuschaltenden Gens haften. Hierbei wird ein Doppelstrang gebildet, der nicht mehr translational umgesetzt und dann eliminiert wird. Auf diese Art wird die Herstellung des Zielproteins verhindert.⁸⁰ Unter den verfügbaren RNAi Vektoren wurden *hairpin*-basierte Vektoren (*short-hairpin RNA* und künstliche microRNA) entworfen, um endogen gebildete RNA zu imitieren. Diese RNA Vektoren erzielen auf lange Sicht eine vielversprechende Genexpressionshemmung.⁸¹ Man spricht bei RNAi-vermittelter Genexpressionshemmung von einem *knock-down* des Zielgens. Die Effizienz des *knock-down* Effektes ist abhängig vom Erfolg der Transfektion (zytosolisches *Delivery*), von der Stabilität der Proteine und vom Design der siRNA.

Gerade die Leber ist ein Pionierorgan, was die Entwicklung RNAi-basierter Therapeutika angeht. Sie spielt eine zentrale Rolle im Metabolismus, der Entgiftung, der Eisenhomöostase, sowie Synthese und Sekretion wichtiger Plasmaproteine. Mit RNAi-basierten Therapeutika könnten demnach theoretisch viele Krankheiten in der Leber therapiert werden.⁸² Das HCC wurde als einer der ersten Tumore mit siRNA behandelt, die gegen onkogene Sequenzen gerichtet ist. Die Studie von Judge et al. nutzte beispielsweise siRNA Moleküle, die in *stable nucleic acid lipid particles* (SNALP) verpackt wurden und gegen Polo-like-Kinase 1 (PLK-1)

oder *Kinesin spindle protein* (KSP) gerichtet sind. Dieser Therapieansatz konnte durch ein signifikant verbessertes Überleben im Maustumormodell validiert werden. Die Therapie wurde 2010 auch in einer klinischen Phase I Studie getestet.⁸³ Es existieren noch eine Reihe anderer RNAi-basierter Therapiestrategien beim HCC, die auf eine Vielzahl anderer Gene, wie dem Oncoprotein p28GANK oder Urokinase-typ Plasminogen Activator uPA gerichtet sind.^{83, 84, 85}

Für die hier beschriebenen Versuche musste die synthetische siRNA in ihrem klassischen Design bestimmte Anforderungen erfüllen, was die Länge und das doppelsträngige Format betraf. Außerdem sollte sie für die Interaktion mit RIG-I im Zytosol transportiert werden können. Obwohl eine klassische siRNA RIG-I nicht aktiviert, kann durch das Anhängen einer 5'Triphosphat-Modifikation und das Vermeiden eines 3'-Überhangs eine RNA generiert werden, die das *gene silencing* mit einer RIG-I-Aktivierung in einem Molekül (5'ppp-siRNA) kombiniert.⁷² Abbildung 5 zeigt ein solches bifunktionelles siRNA Molekül mit 5'ppp Modifikation.

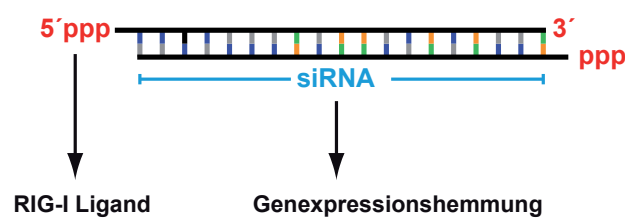


Abbildung 5: Struktur eines bifunktionellen siRNA Moleküls mit 5'ppp-Modifikation. Durch das Anhängen einer 5'ppp-Modifikation und das Vermeiden eines 3'-Überhangs an eine siRNA, kann ein bifunktionelles Molekül generiert werden, das *gene silencing* mit RIG-I-Aktivierung kombiniert.

Die Studie von Ellermeier et al. beschreibt beispielhaft ein bifunktionelles 5'ppp-siRNA Molekül, das einerseits das immunsupprimierende Molekül TGF- β_1 ausschaltet und andererseits in Pankreaskarzinomzellen eine Typ I-IFN-vermittelte Immunantwort sowie Apoptose auslöst.⁸⁶

1.5 Polo-like-Kinase 1 als Zielstruktur für die Tumorthherapie

Als mögliche Zielstruktur kommt das Protoonkogen Polo-like-Kinase 1 (PLK-1) in Frage, das eine zentrale Funktion in der Regulation des Zellzyklus proliferierender Zellen einnimmt und dessen Wegfall den Untergang der Zelle bedeutet.

Die Dauer und Abfolge der einzelnen Zellzyklusphasen werden an Kontrollpunkten, den so genannten *Checkpoints* überwacht. Sie sind dafür zuständig, dass der nächste Schritt im Zellzyklus erst dann erfolgt, wenn der vorherige abgeschlossen ist. An den Kontrollpunkten besteht die Möglichkeit, den Zellzyklus anzuhalten oder den Zelltod einzuleiten. Hierfür existieren spezielle Zellzyklusproteine, wozu die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) zählen. Diese phosphorylieren und aktivieren spezifisch andere Proteine und steuern auf diese Weise den Zellzyklus.

Die Familie der PLK gehört zu den Regulatoren des Zellzyklus. Das erste Familienmitglied der PLK war Polo, eine Serin/Threonin-Kinase in *Drosophila melanogaster*. Beim Menschen wurden nachfolgend vier PLK-Mitglieder identifiziert: PLK-1, PLK-2 (auch als SNK bekannt), PLK-3 (auch als FNK oder PRK bekannt) und PLK-4 (auch als SAK bekannt).^{87, 88} Viele Studien haben gezeigt, dass die PLK verschiedene Funktionen während der Mitose erfüllen und eine signifikante Bedeutung bei der Sicherung der Genauigkeit der *Checkpoint*-Kontrolle haben. Der am besten charakterisierte Vertreter ist PLK-1.^{88, 89}

Die Aktivierung des Komplexes aus Cyclin B/Cdc2 triggert das Eintreten in die Mitose. PLK-1 phosphoryliert und aktiviert die Cyclin-abhängige Phosphatase Cdc25C, was die hemmende Phosphorylierung von Cdc2 umkehrt. Zusätzlich phosphoryliert PLK-1 Cyclin B während der Prophase und erleichtert später die Degradierung in der Mitose. Während des Zyklus erreicht PLK-1 das höchste Expressionslevel in der G2/M-Phase. PLK-1 wird für die Zentrosom-Reifung, die Bildung des bipolaren Spindelapparates und das Fortschreiten in die Zytokinese benötigt. Während verschiedener Mitosestadien wird PLK-1 mit Mikrotubuli und Zentrosomen assoziiert. Eine Hemmung durch PLK-1-neutralisierende Antikörper endet in einer monoastralen Anordnung, was zu einer Fehlregulation der Chromosomen führt. Des Weiteren reguliert PLK-1 die Zellteilung und reagiert an *Checkpoints* auf DNA-Schäden.⁹⁰ In Abbildung 6 sind die verschiedenen Funktionen von PLK-1 im Zellzyklus schematisch dargestellt.

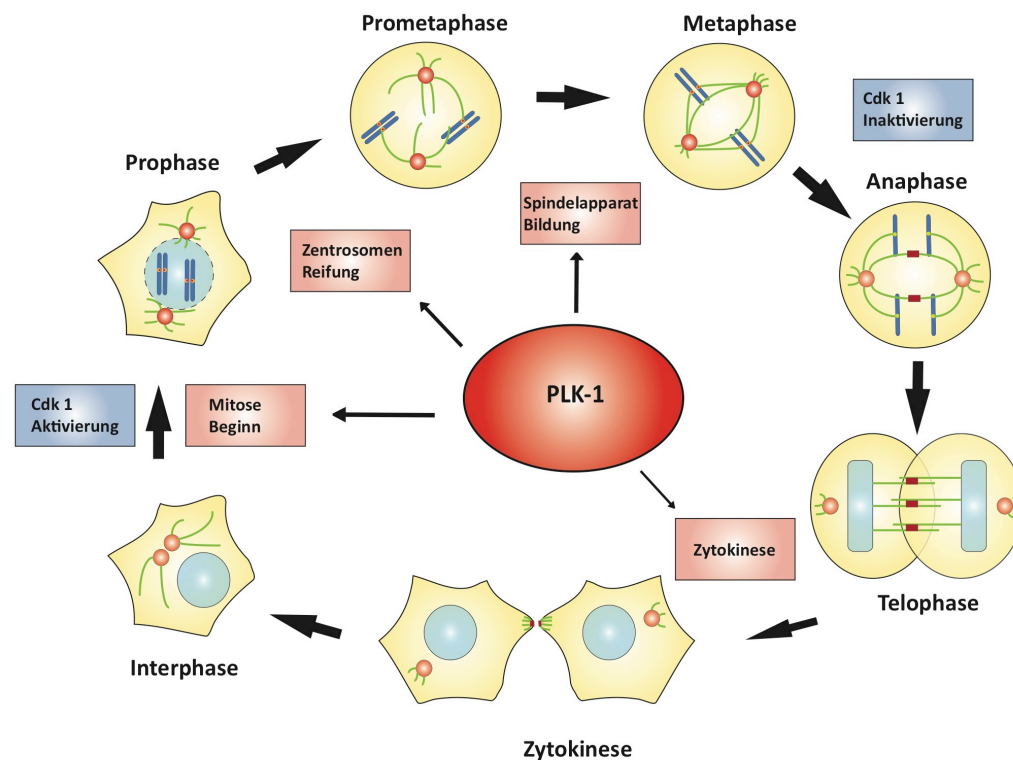


Abbildung 6: Funktionen von PLK-1 während des Zellzyklus. PLK-1 leitet den Mitosebeginn ein und wird für die Zentrosom-Reifung, die Bildung des bipolaren Spindelapparates und das Fortschreiten in die Zytokinese benötigt. Während verschiedener Mitosestadien wird PLK-1 mit Mikrotubuli und Zentrosomen assoziiert. (modifiziert nach Barr et al., 2004)

PLK-1 wird in schnell proliferierendem Gewebe mit instabilem Genom, wie Krebszellen, stark exprimiert.⁹⁰ Einige wissenschaftliche Arbeiten beschreiben eine erhöhte Expression von PLK-1 in verschiedenen menschlichen Tumoren. Hierzu zählen das Mammakarzinom, das Ovarialkarzinom, gastrointestinale Karzinome, das Melanom sowie das HCC.^{88, 91, 92} Interessanterweise korreliert die Überexpression von PLK-1 in einigen Tumoren, wie auch dem HCC, mit einer schlechteren Prognose^{88, 93, 94}

Die Hemmung von PLK-1 hält den Zellzyklus in gesunden Zellen zumindest für die ersten Teilungen nicht an. In Tumorzellen hingegen kommt es zu einem Stillstand des Zyklus.⁹⁰ Das stellt eine wichtige Erkenntnis dar. PLK-1 wird hierdurch zu einem attraktiven Ziel in der Krebstherapie. Tatsächlich konnte PLK-1 als Zielstruktur in der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen in einigen *in vitro* und *in vivo* Studien validiert werden.⁹⁵ Zudem konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PLK-1-Expression Apoptose in Tumorzellen auslöst.⁸³

1.5.1 PLK-1 und HCC

Studien belegen, dass die Expression von PLK-1 im HCC signifikant höher ist als im gesunden Lebergewebe. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen PLK-1 und HCC-Zelldifferenzierung bzw. Kapselinvasion gezeigt werden.⁹⁶ Für das HCC wurden mehr als 300 *Microarray* Studien publiziert, die deregulierte Gene identifizierten. Chen et al. analysierten 102 primäre HCC-Proben und verglichen sie mit 74 gesunden Leberproben auf die Genexpression. Dabei fanden sie heraus, dass im HCC Regulationsgene des Zellzyklus, wie PLK-1, vermehrt exprimiert werden.⁹⁷ In der HBV-vermittelten Karzinogenese haben Tierstudien gezeigt, dass das virale X Protein eine Rolle als schwaches Onkogen oder Kofaktor in der Pathogenese des HCC spielt. Das HBV X Protein (pX) aktiviert zelluläre mitotische Signalwege und dereguliert die hepatozytäre Genexpression. Eine erhöhte Expression von PLK-1 konnte nachgewiesen werden und dass die Hemmung von PLK-1 wiederum die pX-vermittelte Transformation der Hepatozyten unterdrückt.^{98, 99}

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In den vergangenen Jahren zeigte die Immuntherapie Erfolge in der Tumorthherapie. Ziel dieser Arbeit war durch Aktivierung von RLH eine neue Therapieoption für das HCC zu evaluieren. Dazu sollte untersucht werden, ob RIG-I in HCC-Zelllinien funktionell aktiv ist und Zelltod auslöst. Darüberhinaus sollte der bifunktionelle ppp-siRNA Therapieansatz evaluiert werden. Hierzu wurde PLK-1 als Zielgen gewählt, da es Zellzyklus und Proliferation im HCC an zentraler Stelle reguliert. Die zugrundeliegende Idee ist die Verstärkung des Tumorzelltodes durch Kombination der beiden Therapieansätze.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- Exprimieren HCC-Zellen RIG-I und ist dieses funktionell aktiv?
- Löst die RIG-I-Stimulation in HCC-Zellen Zelltod aus?
- Ist PLK-1 ein geeignetes Ziel-Gen im HCC, um Zelltod auszulösen?
- Üben PLK-1-Inhibition und RIG-I-Aktivierung einen additiven Effekt auf Zelltod aus?
- Generierung und Evaluation einer bifunktionellen ppp-siRNA gegen PLK-1

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Annexin V - APC (AN)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Deutschland
Elisa Substrat Reagent A/B	BD Pharmingen, San Diego, USA
Erylyse	Morphisto, Frankfurt, Deutschland
Ethanol (100 Vol %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FACSFlow, FACSSafe	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Glycin	Carl Roth Gmbh, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran (Forene [®])	Abbott, Zug, Schweiz
Isopropanol (70 Vol %)	Apotheke Innenstadt, LMU München
Lipofectamine [®] RNAiMAX	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Paclitaxel	Apotheke Innenstadt, LMU München
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Poly(I:C)-LMW	Invivogen, San Diego, USA
Propidium Iodid (PI)	PharMingen, San Diego, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , 2N)	Apotheke Innenstadt, LMU München
TMB Substrate Reagent Set	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Triton	Apotheke Innenstadt, LMU München
Trisaminomethan (TRIS)	Carl Roth Gmbh, Karlsruhe, Deutschland
Trypan-Blau	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin (10 x)	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Carl Roth Gmbh, Karlsruhe, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfgefäße: Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polystyrene Roundbottom Tubes	Dickinson, San Jose, CA, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Gilson, Middleton, USA
PCR-Tubes	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Oligonukleotide und TLR-Liganden

DNA-templates für ppp-RNA	Eurofins MWG Synth., Ebersberg, Deutschland
---------------------------	---

Bovines Serum Albumin (BSA)	Gibco BRL, Paisley, GB
DNase I	Roche, Mannheim, Deutschland
DMEM Zellkulturmedium <i>high glucose</i>	PAA, Pasching, Österreich
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Paisley, GB
Kollagense D	Roche, Mannheim, Deutschland
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Microscope Glass Bottom Dishes	MatTec, Ashland, MA, USA
MycoAlert® <i>Mycoplasma-Detection-Kit</i>	Lonza, Basel, Schweiz
Natrium-Pyruvat	PAA, Pasching, Österreich
Opti-MEM® I <i>Reduced Serum Medium</i>	Gibco, Paisley, GB
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin / Streptomycin (100 x)	PAA, Pasching, Österreich

Weitere Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg, D), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB), Falcon (Heidelberg, D), Greiner (Frickenhäusen, D), Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, D), Nunc (Rochester, USA) und Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen.

2.1.6 Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer

Medien und Puffer für die Zellkultur:

DMEM-Vollmedium: 10 Vol % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin in DMEM-Medium

Transfektionsmedium: 10 Vol % FCS, 2 mM L-Glutamin in DMEM-Medium

Trypsin-EDT: 10 Vol % Trypsin, 0,65 mM EDTA in PBS

FCS-EDTA: 2 mM EDTA in FCS

Einfriermedium: 90 Vol % FCS, 10 Vol % DMSO

Das verwendete FCS wurde vor Gebrauch bei 60°C für 30 Minuten im Wasserbad hitzebehandelt um die Komplementfaktoren zu vernichten.

ELISA, Durchflusszytometrie, Western Blot:

Coating buffer 1: 0,2 M Natriumphosphat, pH 6,5 in *aqua dest.*

Coating buffer: 20,1 mM Natriumcarbonat, pH 9,5 in *aqua dest.*

Assay diluent: 10 Vol % FCS, pH 7,0 in PBS

Reagent diluent / Block buffer: 1 % BSA, pH 7,0 in PBS

Wash buffer: 0,05 Vol % Tween 20, pH 7,0 in PBS

FACS-Puffer: 2 Vol % FCS, 2 mM EDTA in PBS

Lämmli-puffer (6x), pH 6,8: 1,2 g SDS, 2 mg Bromphenolblau, 4,7 ml Glycerol, 1,2 ml 0,5 M TRIS, 4,1 ml gereinigtes H₂O, 0,93 g DTT

Sammelgel (4x) pH 6,8: 30,25 g TRIS in 300 ml H₂O gereinigtes H₂O ad 1000 ml, 4 g SDS, 10 mg Bromphenolblau

Laufpuffer (10x): 30,2 g TRIS, 144 g Glycin, 10 g SDS, H₂O ad 1000 ml

Trenngel (4x), pH 8,8: 182 g TRIS in 600ml H₂O, gereinigtes H₂O ad 1000 ml, 4 g SDS

Wet-transfer-Puffer: 24,22 g TRIS, 150,12 g Glycin, 200 ml Methanol, gereinigtes H₂O ad 2000 ml

TBST, pH 7,6: 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20

2.1.7 Technische Ausstattung

BD FACS Canto II
FACSCalibur
CO₂-Inkubator für Zellkultur (BD 6220)
Laminare Flow für Zellkultur
LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System
Zentrifuge 5424
Mithras LB940 Plattenlesegerät
Inverses Lichtmikroskop
Multifuge 3L-R
Neubauer-Zählkammer Optik
Schüttler
Vortex VF2
Vortex Genie 2
Photometer: Ultrospec 3000 pro
Waage (LP 6209)
Waage (SBC 21)
Fluoreszenz Mikroskop Axiovert 2000
Fujifilm LAS-4000 Chemilumineszenz
Lesegerät

BD Biosciences, USA
Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Heraeus, Hanau, Deutschland
Heraeus, Hanau, Deutschland
Roche, Penzberg, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Berthold Technologies, Bad Wildbad, D
Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Heraeus, Hanau, Deutschland
Labor Frischknecht, Balgach, Deutschland
NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Amersham Pharmacia Biotech
Sartorius, Göttingen, Deutschland
Scaltec Instruments, Heiligenstadt, D
Carl Zeiss, Jena, Deutschland
LI-COR Biotechnology, Bad Korb, D
Deutschland

2.1.8 HCC-Zelllinien

Die murine Zelllinie Hepa1-6 ist ein Derivat des BW7756 Hepatoms, das in einer C57/L Maus entstand. Dabei handelt es sich um adhärenzte Zellen, die als Monolayer wachsen.

Die humane Zelllinie Hep3B wurde 1976 aus einer Lebertumor-Biopsie eines acht-jährigen Jungen mit HCC etabliert⁸. Bei der Zelllinie Hep3B handelt es sich um eine humane Zelllinie, die zwar Teile eines viralen Genoms enthält, jedoch keine infektiösen Viruspartikel abgibt. Die Zelllinie exprimiert das Haupt-Oberflächenprotein HBsAg. Die Zelllinien wurden vom Leibniz-Institut, der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, in Braunschweig erworben.

2.1.9 Computerprogramme

Adobe Design Premium CS4	Adobe System, San Jose, CA, USA
FACSDiva Software	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
CellQuest	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
Endnote X6	Thompson Reuter, Carlsbad, CA, USA
FlowJo 8.7	Tree Star, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
LightCycler [®] 480 Software 1.5.0	Roche, Mannheim, Deutschland

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkulturen

Die Tumorzelllinien wurden in Kulturflaschen der Größe 75 bis 175 ml kultiviert. Als Kulturmedium wurde das DMEM High Glucose Vollmedium mit einem Zusatz von 10 % FCS, 100 IU/ml Penicillin/ Streptomycin und 2mM L-Glutamin verwendet. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Medium gewechselt, überschüssige Zellen wurden entfernt. Für Experimente wurden die Zellen in 6- bis 96-well-Flachbodenplatten kultiviert. Die Zellkultur fand in einem Begasungsbrutschrank bei 95 % Luftfeuchtigkeit, einem CO₂-Luftgemisch von 5 % und einer Temperatur von 37°C statt. Sämtliche Zell-Experimente wurden ausschließlich unter sterilen Kautelen unter einer Laminar-Air-Flow durchgeführt. Zur Ermittlung des Anteils der vitalen Zellen wurde der Trypan-Blau Ausschlusstest durchgeführt. Die Anzahl der Zellen ließ sich nach entsprechender Verdünnung mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer lichtmikroskopisch ermitteln.

2.2.2 Transfektion der HCC-Zellen

In dieser Arbeit wurden Transfektionsreagenzien verwendet, die die Nukleinsäuren durch die Bildung von so genannter Lipoplexe in das Zellinnere einschleusen und nach Fusion mit der Zellmembran in die Zelle freisetzen.¹⁰⁰ Es wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX eingesetzt. Zur Transfektion wurden die HCC-Zellen über Nacht in Flachbodenplatten ausplattiert, so dass sie am nächsten Morgen adhärent waren und ungefähr eine Konfluenz von 60-70 % hatten. Für die Aussaat der HCC-Zellen wurde DMEM Vollmedium ohne Zusatz von Antibiotika (Transfektionsmedium) genutzt. Beim Vorgang der Transfektion wurden die RNA und das Transfektionsagens zuerst getrennt in gleiche Mengen Opti-MEM® I *Reduced Serum Medium* gegeben, kräftig geschüttelt und anschließend zusammengemischt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur bildeten sich die Lipoplexe und es erfolgte die Transfektion der HCC-Zellen in frischem Medium. Das optimale Verhältnis von RNA und Lipofectamine® RNAiMAX wurde durch Kreuztitrationen ermittelt. Für 500 ng RNA wurden 0,75 μ l Lipofectamine® RNAiMAX verwendet. Zur Kontrolle wurden die Zellen in jedem Experiment mit einer RNA ohne 5'-Triphosphatmodifikation (OH-RNA) in derselben Konzentration transfiziert. Zudem dienten unbehandelte HCC-Zellen als weitere Kontrolle. Für Versuche mit siRNA wurde ein analoges Verhältnis von RNA und Transfektionsreagenz verwendet. 24 h nach der ersten Transfektion erfolgte gegebenenfalls noch eine zweite.

2.3 Funktionelle Analysen

2.3.1 Enzyme-linked immunosorbent assay

Zur Konzentrationsbestimmung von humanem und murinem CXCL10 im Überstand der Zellkulturen wurde ein *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Hierzu wurden Zell-freie Kulturüberstände 24 h nach Transfektion abgenommen und bei Bedarf mit Medium verdünnt. Die Bestimmung erfolgte mittels ELISA-Kit nach den Protokollangaben des Herstellers (R&D Systems, Abingdon, UK). Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe eines *Multi-Plate-Readers* detektiert. Die Quantifizierung geschah über eine Standardreihe. Laut Angaben des Herstellers lag die untere Nachweisgrenze bei 1,67 pg/ml für humanes und bei 2,2 pg/ml für murines CXCL10.

2.3.2 Durchflusszytometrische Zellanalyse

2.3.2.1 Zelltodanalyse mittels Annexin V- und Propidiumjodid-Färbung

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung des Zelltodes wurden HCC-Zellen mit Annexin V und Propidiumjodid (PI) gefärbt. Hierzu wurden die Tumorzellen 24 h nach poly(I:C)- bzw. 48 h nach 5'-ppp-RNA-Behandlung geerntet, in FACS Röhrchen überführt, zwei Mal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 150 μ l eines kalziumhaltigen Puffers mit 1 μ l Annexin V-APC und kurz vor der FACS Analyse mit 1 μ l PI gefärbt. Die Proben wurden gut gemischt, auf Eis gehalten und durchflusszytometrisch analysiert.

Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin (PS), welches in früh apoptotischen Zellen von der inneren Zellschicht auf die äußere transloziert. Bei den Versuchen dieser Arbeit wurde an Allophycocyanin (APC)-gekoppeltes Annexin V verwendet. Erst nach Zerstörung der Zellmembran werden diese für PI permeabel. Lebende Zellen mit intakten Membranen schließen PI aus. Daher ist mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Unterteilung der Tumorzellen in viable Zellen (Annexin V-/ PI-), in früh apoptotische HCC-Zellen (Annexin V+/ PI-) und in sekundär apoptotische bzw. nekrotische HCC-Zellen (Annexin V+/ PI+) möglich. Für die Auswertung dieser Experimente wurde die Vitalität der behandelten Gruppen jedes Mal in Relation zu den viablen HCC-Zellen der unbehandelten Kontrolle (Annexin V-/ PI-) angegeben. Die spontane Zelltodrate lag bei den unbehandelten Kontrollen bei etwa 9 %.

2.3.2.2 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Für die Zellzyklusanalyse wurden die adhärenenten Zellen zunächst geerntet. Die abgelösten Zellen wurden in FCS Medium aufgenommen, in ein FACS Röhrchen überführt, mit PBS versetzt und zwei Mal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 70 % Methanol resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Dieser Schritt diente der Permeabilisierung der Zellmembran. Danach erfolgte eine erneute doppelte Waschung der Zellen mit PBS. Anschließend wurde jeder Zellsuspension RNase A (in 1:5 Verdünnung) hinzugegeben, um eine unerwünschte mögliche Wechselwirkung des DNA Farbstoffs mit RNA zu verhindern. Nach 30 min Inkubation bei 37°C und erneutem Waschschrift, folgte die PI-Färbung und die Zellsuspension wurde für 20-30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Dann

wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle diente das Mitosegift Paclitaxel.

Bei der Zellzyklus-Analyse bestand ein linearer Zusammenhang zwischen DNA-Gehalt und Fluoreszenzintensität. Dies war nur gegeben, wenn der rote Farbstoff PI im Überschuss zu den Zellen gegeben wurde. PI interkaliert in die DNA und färbt auf diese Weise die Zellen an.

Bei der Daten-Akquisition legte man die x-Achse so fest, dass die G1-Phase des Zellzyklus (ein diploider Chromosomensatz) bei Kanal 200 lag. Zellen in der G2/M-Phase erscheinen im Kanal 400, da sie die doppelte DNA-Menge besaßen. Zellen der S-Phase hatten einen unterschiedlichen DNA-Gehalt und lagen dazwischen.

2.3.3 CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay

Der CellTiter-Blue[®] *Cell Viability Assay* wurde für die Bestimmung der Viabilität der HCC-Zellen nach Behandlung mit RLH-Liganden verwendet. Die Messung erfolgte 24 h nach Transfektion mit poly(I:C) bzw. 48 h mit 5'ppp-RNA. Das CellTiter-Blue[®] Reagenz enthält den blauen Redoxfarbstoff Resazurin und wurde im Verhältnis 1:5 direkt auf die Zellkultur pipettiert. Nach Zugabe des Reagenz setzten metabolisch aktive Zellen Resazurin in den pinkfarbenen, fluoreszenten Farbstoff Resorufin um. Die Messung des Signals erfolgte bei den Zellen nach einer Inkubationszeit von ein bis vier Stunden. Das Fluoreszenzsignal entsprach der Menge an gebildetem Resorufin und war direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Das Signal wurde in einem *Multi-Plate-Reader* bei 570 nm detektiert.

2.4 Molekularbiologische und -chemische Methoden

2.4.1 Proteinanalyse mittels Western Blot

Die Phosphorylierung von IRF3 und Expression von RIG-I wurden mittels Western Blot analysiert. Hierfür wurden die Proben durch das Zugeben von 50 μ l eines sechsfachen SDS-haltigen Lämmli-Puffer aus der Kulturplatte gelöst und für fünf min bei 95°C auf dem Thermoschüttler erhitzt. Es wurden Gele mit einem Volumenanteil von 10 % Acrylamid bei einer Stromstärke von 30 mA über 80 min zur Auftrennung der Proteine verwendet. Der Transfer wurde mit dem *Semidry-blot-System* von Biorad durchgeführt. Bei 360 mA wurden die aufgetrennten Proteine über eine Zeit von 60 min auf eine Membran geblottet.

Anschließend wurde die Membran mit *Tris-buffered Saline and Tween 20* (TBST) gewaschen. Um spätere unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurde sie in einer *Blocking*-Lösung inkubiert.

Nach weiteren Waschschritten mit TBST erfolgte die Proteindetektion anhand der spezifischen Antikörper. Für pIRF3 wurde der *rabbit anti-mouse* pIRF3 (Ser 396) Antikörper und für RIG-I, der *rabbit anti-mouse* RIG-I Antikörper (Klon: ALME-1) verwendet. Als Sekundärantikörper diente an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltes *anti-rabbit* IgG. Zur Visualisierung wurde die Membran mit einem *enhanced-chemiluminescence*-(ECL-) Substrat benetzt, welches nach Oxidation ein Lichtsignal abgibt, das mittels Fujifilm LAS-4000 Chemolumineszenz Lesegerät detektiert wird.

2.4.2 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription ist eine molekularbiologische Methode zur enzymatischen Herstellung von RNA außerhalb einer Zelle. Hierbei wird mit Hilfe DNA-abhängiger RNA-Polymerasen von einem DNA-Strang (*Template*) ein RNA-Strang synthetisiert, der komplementär zur Nukleotidabfolge des *Template*-Stranges ist. Oftmals wird dabei die T7 RNA-Polymerase verwendet, die eine Triphosphat-Gruppe am 5'-Ende generiert.

Zunächst wurde das doppelsträngige DNA-*Template* hergestellt, wofür der T7 *Promoter-Primer* mit den einzelsträngigen DNA-*Templates* im Hybridisierungspuffer (TE-Puffer: 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7,4) bei 75°C erhitzt wurde. Hierbei erfolgte die Bindung des *Primers* an die DNA-*Templates*. Nach dem Abkühlen wurde die Exo-Minus Klenow DNA-Polymerase, der Klenow *Fill-in* Puffer und 2 μ l des dNTP Mix hinzugefügt um das doppelsträngige *Template* zu bilden. Nach weiterem Erhitzen auf 75°C sind die *Templates* fertig zum weiteren Gebrauch.

Nun erfolgte der Transkriptionsansatz mit dem Fermentas Kit. Der Ansatz bestand aus den besagten DNA-*Templates*, den entsprechenden Anteilen an NTPs, 10 x T7-Rxn Puffer, T7-Polymerase und RNase-freiem Wasser. Hierbei wurden die *sense* und *antisense* Stränge jeweils separat hergestellt, für mehrere Stunden bei 37°C inkubiert, zusammen pipettiert und über die Nacht wieder bei 37°C inkubiert.

Für den Verdau der DNase wurden am nächsten Tag Turbo-DNase zum DNA-*Template* gegeben und erneut bei 37°C für 30 min inkubiert. Die DNase wurde danach durch Ammoniumacetat wieder inaktiviert. Zur Aufreinigung wurde die neue RNA mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol vermischt und für 5 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Hierbei

bildeten sich zwei Phasen. Die untere Phase beinhaltete das Chloroform. Die obere Phenol-Phase, die die komplette RNA enthielt, wurde dann in ein neues Gefäß überführt und noch einmal mit Chloroform durchmischt und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Fällung der RNA, wofür wieder die obere Phase abpipettiert, mit 100 % Ethanol vermennt und mindestens für 2 h bei - 20°C gelagert wurde. Bei diesen Temperaturen fällt die RNA aus. Es wurde bei 4°C und 14.000 x g zentrifugiert, danach konnte das Phenol-Ethanol-Gemisch komplett abgenommen und das RNA-Pellet in RNase-freiem Wasser gelöst werden. Mit Hilfe des NanoPhotometers ließ sich die Konzentration der RNA ermitteln (Absorption bei 260 und 280 nm). Alle so erstellten ppp-RNA wurden vor Verwendung auf ihre Funktionsfähigkeit getestet.

2.4.3 Extraktion von RNA aus Tumorzellen

Zur Isolation zytoplasmatischer RNA wurde das peqGOLD Total RNA Kit von PEQLAB verwendet. Durch Zugabe von 400 μ l eines RNA Lysis Buffer T erfolgte die Lyse der zuvor behandelten HCC-Zellen und zugleich die Inaktivierung von RNasen. Das Lysat wurde auf ein *DNA Removing Column* geladen und anschließend zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde mit einem identischen Volumen 70 %-igem Ethanol (400 μ l) versetzt und durch Vortexen sorgfältig gemischt. Die Probe wurde dann auf ein *PerfectBind RNA Column* pipettiert und es folgten die Waschschritte mit Waschpuffer I, danach mit Waschpuffer II. Darauf erfolgte ein Trocknungsschritt bei dem das Column zwei min zentrifugiert wurde. Zum Eluieren der RNA wurde das *PerfectBind RNA Column* in ein sauberes Zentrifugengefäß gesteckt und die RNA mit 100 μ l sterilem RNase-freien dH₂O vermischt. Dazu wurde dH₂O direkt auf die Matrix pipettiert und zentrifugiert. Die extrahierte RNA Menge wurde dann photometrisch bestimmt und entweder sofort analysiert oder bei -20°C konserviert.

2.4.4 Reverse Transkription

Bevor die isolierte RNA über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden konnte, musste sie revers transkribiert werden und es sollte die Umschreibung in einen *copy*-DNA (cDNA)-Einzelstrang erfolgen. Zur Durchführung der cDNA Synthese wurde das *ProtoScript M-MuLV First Strand DNA Synthesis Kit* (New England BioLabs, Deutschland) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt neben der RNA Probe und dem Transkriptionspuffer

jeweils oligo(dT)- und RiboLock™ RNase Inhibitor sowie den dNTP Mix und Revert Aid™ H Minus Reverse Transkriptase. Diese Reaktion sollte auf Eis stattfinden und am Ende gemischt werden. Anschließend wurde der Reaktionsansatz im Thermocycler (Biometra GmbH) für eine h bei 42°C, dann 10 min bei 72°C erhitzt, um die Transkriptase zu inaktivieren. Die fertige cDNA konnte nun für die quantitative *RealTime*-PCR weiterverwendet werden.

2.4.5 Quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR)

Zur Messung der mRNA-Expression mittels quantitativer *RealTime*-PCR (qRT-PCR) wurde das *LightCycler 480 Probes-Master-Kit*, der Light Cycler 480 II von Roche und Sonden der *Universal Probe Library* von Roche verwendet. Die genspezifischen Primer wurden mit Unterstützung eines *Assay-design*-Programms von Roche gestaltet (www.universalprobelibrary.com), mit einer entsprechenden Probe aus der *Universal Probe Library* kombiniert und bei MWG Biotech oder Metabion erworben. Als *housekeeping* Gen (Bezugsgen) wurde das konstitutiv exprimierte β -Actin verwendet, zu welchem jede Probe in Relation gesetzt wurde.

Zielgene murin	Sequenz forward	Sequenz reverse
HPRT	GGAGCGGTAGCACCTCCT	CTGGTTCATCATCATCGCTAATCAC
RIG-I	GACCCACCTACATCCTCAG	GGCCCTTGTTGTTCTTCTCA
MDA5	CACCTGCAATTCAAAAATCTTA	CTATTAACCGTGTTCAAAACATGAA
IFN- β	CCCAGTGCTGGAGAAATTGT	ACTGCCTTTGCCATCCAA
β -Actin	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAG TCCG
PLK-1	TTGTAGTTTTGGAGCTCTGTC	AGTGCCTTCCTCCTCTTGTC
Zielgene human	Sequenz forward	Sequenz reverse
β -Actin	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
RIG-I	TGGACCCTACCTACATCCTGA	GGCCCTTGTTGTTTTTCTCA
MDA5	AGTTTGGCAGAAGGAAGTGTC	GGAGTTTTCAAGGATTGAGC
IFN- β	CCCAGGAGGTTCTCAACAAT	CTTGCTATTTTCAGACAAGATTCA
PLK-1	CACAGTGTCAATGCCTCCAA	TTGCTGACCCAGAAGATGG

Ein PCR-Reaktionsansatz enthielt je Bedingung einen zweifachen Ansatz aus den folgenden

Bestandteilen: 5 μ l *Light Cycler 480 Probes Mastermix*, 1,5 μ l reines ddH₂O, 0,1 μ l der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff-Sonde, je 0,2 μ l der Primerpaare und 3 μ l der zuvor in cDNA umgeschriebenen mRNA. Dies ergab ein Gesamtvolumen von 10 μ l, das in eine spezielle PCR 96-Well Platte pipettiert wurde.

2.5 Konfokalmikroskopie

Für die mikroskopische Detektion der RNA-Aufnahme wurden HCC-Zellen auf *microscope glass bottom dishes* ausplattiert und mit AlexaFluor488-markierter RNA transfiziert. Die mikroskopischen Bilder wurden mit dem Leica SP5 Konfokalmikroskop aufgenommen und mit Adobe Photoshop CS4 zu einer verbesserten Kontrastierung und Größe bearbeitet.

2.6 Statistische Analyse

Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe der Software SPSS. Signifikante Unterschiede zweier Mittelwerte wurden durch den ungepaarten *Student's-t-Test* für unabhängige Variablen berechnet. Für mehrfache Vergleiche wurde die *One-way Analysis of Variances* (ANOVA) angewandt. Wenn der p-Wert unter 0,05 lag (*), galten Unterschiede als signifikant. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse und Textverarbeitung wurden folgende Programme genutzt: Adobe Illustrator CS4, GraphPad Prism (Version 5), FlowJo 8.7 und Microsoft Word 2011.

3. Ergebnisse

3.1 Evaluation von RIG-I als Zielstruktur für die Immuntherapie des HCC

3.1.1. Evaluation der RIG-I-Expression in humanem Tumorgewebe

Als Grundlage für diese Arbeit wurde die RIG-I-Expression in primären humanen HCC-Gewebeproben analysiert. Durch eine Kooperation mit Herrn PD De Toni (Medizinische Klinik und Poliklinik II der Universität München) und Frau Prof. Mayr (Pathologisches Institut der Universität München) standen 179 HCC-Gewebeproben von Patienten, die mit Lebertransplantation oder partieller Hepatektomie behandelt wurden, zur Verfügung.

Die histologische Färbung mit dem α -RIG-I Antikörper (Klon: Alme-I) zeigte in allen Proben eine Positivität mit einer zytoplasmatischen Lokalisation. Die Färbeintensität wurde in drei Grade eingeteilt. 20% der Proben färbten sich schwach, 60% mäßig und 20% stark für RIG-I (Abbildung 8A und B). Somit könnte RIG-I als potenzielle Zielstruktur für die Therapie von Patienten mit HCC dienen.

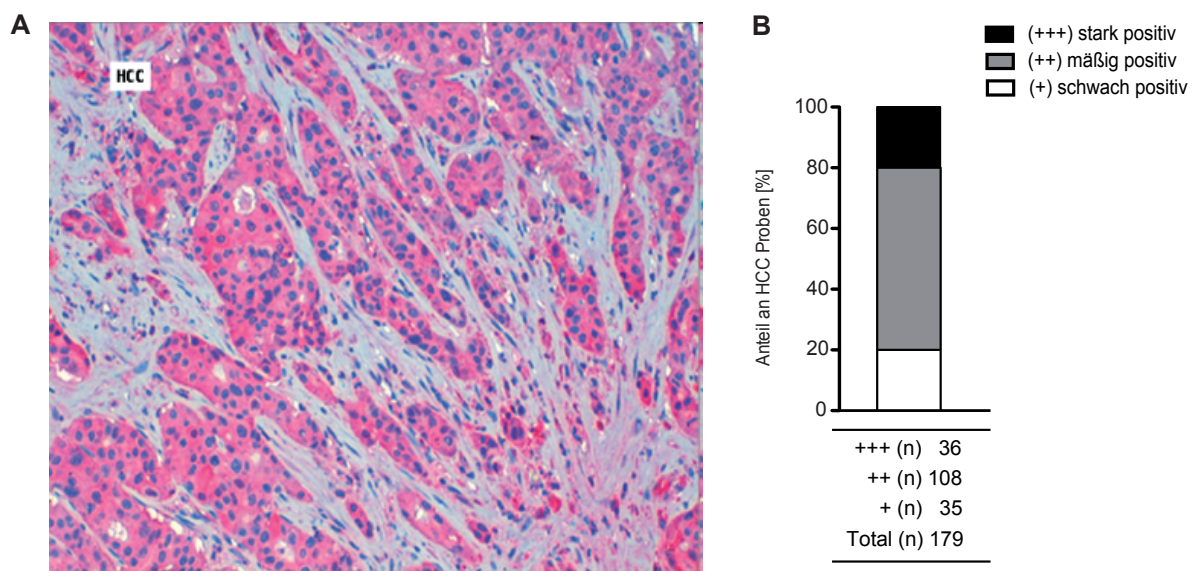


Abbildung 8: Histologische Analyse der RIG-I Expression in humanen HCC-Proben.

Histologisch wurden 179 HCC-Proben von Patienten untersucht, wobei RIG-I in allen Tumorproben nachgewiesen werden konnte. (A) Exemplarisch ist eine histologische Färbung von RIG-I (rosa) dargestellt. (B) Semi-quantitativer Score (nach Remmele et al. 1987) der Färbeintensität. Die Färbeintensität wurde in drei Gruppen unterteilt: (+) schwach positiv, (++) mäßig positiv und (+++) stark positiv. Die Zahlen geben die tatsächliche Anzahl der Gewebeproben pro Gruppe an.

Die Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit PD De Toni und Prof. Mayr durchgeführt.

3.1.2 Expression von RIG-I in humanen und murinen HCC-Zelllinien

Die Expression von RIG-I im humanen HCC lieferte eine wichtige Grundlage für die folgenden Experimente. Um RIG-I als Zielstruktur für die Immuntherapie des HCC zu bewerten, analysierten wir zunächst die RIG-I-Expression in murinen und humanen HCC-Zelllinien mittels Western Blot. Sowohl in murinen Hepa 1-6 Zellen, als auch in humanen Hep3B Zellen ließ sich die Expression von RIG-I detektieren. In Hepa 1-6 Zellen konnte zudem eine RIG-I-Hochregulation nach Stimulation mit Typ I IFN (hier mit IFN- α) demonstriert werden (Abbildung 9 und Abbildung 15).

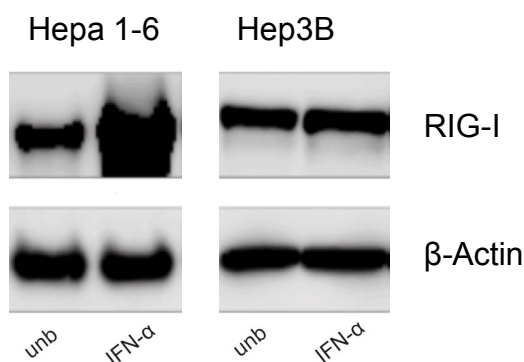


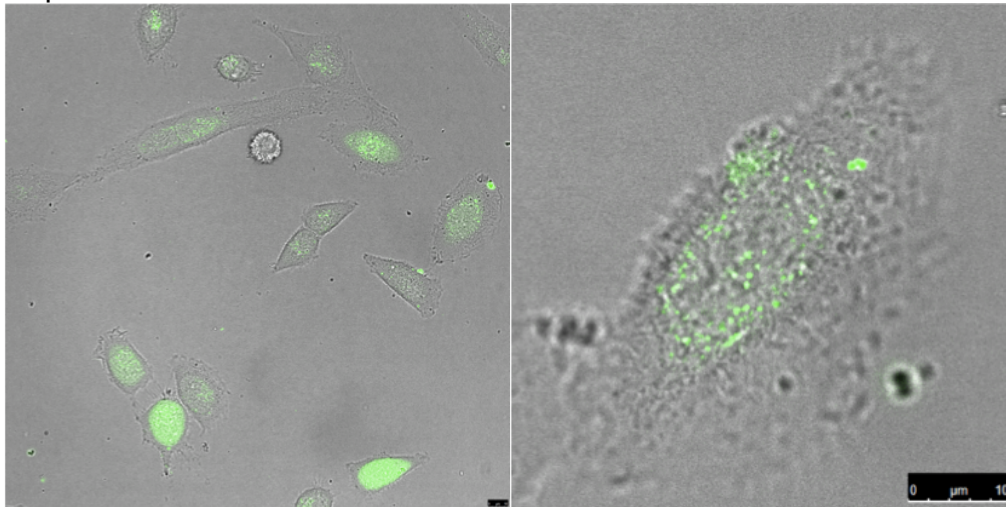
Abbildung 9: Murine und humane HCC-Zellen exprimieren RIG-I. Murine Hepa 1-6 und humane Hep3B Zelllinien wurden auf die Expression von RIG-I mittels Western Blot untersucht. Um die Induzierbarkeit der Expression durch Typ I IFN zu untersuchen, erfolgte die Stimulation der Zellen mit 100 U/ml IFN- α für 24 h. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Überprüfung der Transduktion von HCC-Zellen mit fluoreszierender RNA

In vitro transkribierte 5'ppp-RNA von etwa 20 Nukleotiden Länge induzieren in Zellen die Bildung und Ausschüttung von IFN- α und IFN- β über die Aktivierung von RIG-I.^{50, 51} Um dieses Konzept für die Immuntherapie des Leberkarzinoms zu nutzen, untersuchten wir zunächst, ob sich HCC-Zellen mit RNA transfizieren lassen. In Vorversuchen wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit (Toxizität) gegenüber verschiedenen Transfektionsreagenzien getestet und dabei Lipofectamine[®] RNAiMAX als am geeignetsten bewertet. Darüber hinaus wurde das optimale Mischungsverhältnis von RNA zu Transfektionsreagenz bestimmt.

Um zu zeigen, dass sich komplexierte RNA in HCC-Zellen einbringen lässt, transfizierten wir Hep3B Zellen mit AlexaFluor488-markierter Bcl2-targeting 2.2-RNA und analysierten die Zellen mittels Konfokalmikroskopie und Durchflusszytometrie. Die mikroskopischen Aufnahmen bestätigen die Aufnahme der fluoreszierenden RNA in die Zellen (Abbildung 10.1). Gleichzeitig ließ sich die Aufnahme der RNA (unter denselben Bedingungen) durchflusszytometrisch nachweisen (Abbildung 10.2). Diese Versuche zeigen, dass sich HCC-Zellen transfizieren lassen, was die Grundlage für alle weiteren Experimente lieferte.

Hep3B



Hepa 1-6

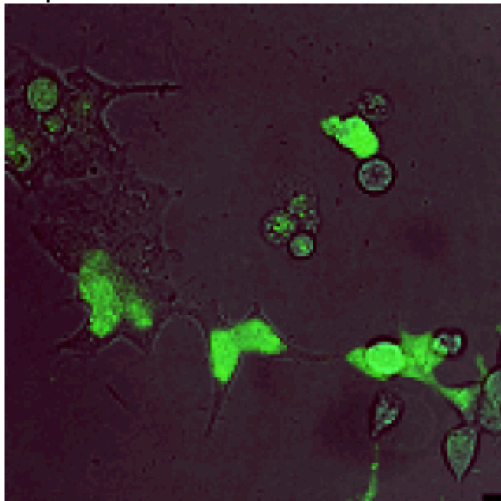


Abbildung 10.1: Mittels konfokaler Mikroskopie lässt sich die Aufnahme der AlexaFluor488-markierten RNA in Hep3B und Hepa 1-6 Zellen detektieren. Dargestellt sind Zellen 4 h nach Transfektion der RNA. Die Zellen wurden mit Komplexen aus 1 $\mu\text{g/ml}$ RNA und 2,5 μl Lipofectamine[®] RNAiMAX transfiziert. Das Fluoreszenz-Signal wurde sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert.

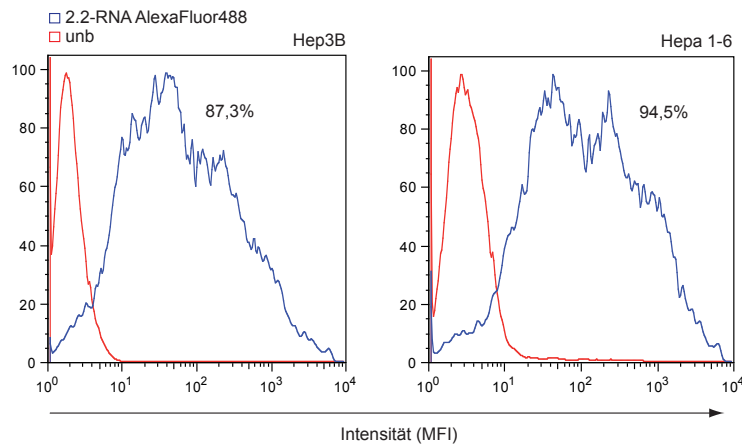


Abbildung 10.2: Aufnahme der AlexaFluor488-markierten RNA in Hep3B und Hepa 1-6 Zellen. HCC-Zellen wurden mit Komplexen aus 1 µg/ml RNA und 2,5 µl Lipofectamine® RNAiMAX transfiziert. 4 h nach Transfektion erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Gezeigt sind repräsentative Daten aus drei unabhängigen Experimenten. MFI = *Mean fluorescence intensity*.

3.2 Charakterisierung der immunstimulatorischen Effekte von RLH-Liganden

3.2.1 Phosphorylierung von IRF3 wird durch RLH-Liganden induziert

Um die Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors IRF3 durch die Kinasen IKK ϵ und TBK1 im Verlauf des RIG-I-Signalweges zu untersuchen, wurde die phosphorylierte Form (pIRF3), welche die Aktivierung von RLH anzeigt, mittels Western Blot analysiert. Hierzu wurden humane und murine HCC-Zellen mit dem MDA5-Liganden poly(I:C) transfiziert. Die Bildung von pIRF3 wurde nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Stunden analysiert (Abbildung 11). Bereits nach zwei Stunden war eine Phosphorylierung von IRF3 in beiden Zelllinien zu detektieren. Eine OH-RNA (ohne RLH-aktivierender Funktion) diente als Kontrolle.

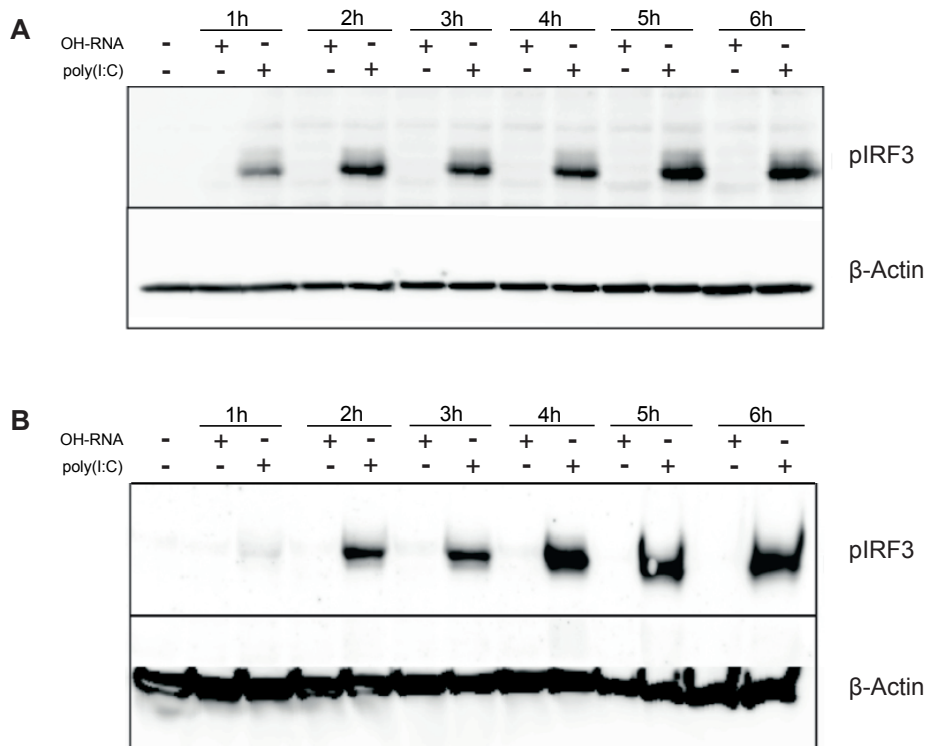


Abbildung 11: Transfektion mit poly(I:C) führt zur Bildung von pIRF3 in HCC-Zellen.

Hep1-6 (A) und Hep3B (B) Zellen wurden mit 500 ng/ml poly(I:C) bzw. OH-RNA (Negativkontrolle) transfiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde pIRF3 mittels Western Blot untersucht. Dargestellt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.2 RLH-Liganden induzieren dosisabhängig die Expression von Typ I Interferon in HCC-Zellen

Nun galt es die Frage zu klären, ob die Transfektion mit den RLH-Liganden 5'ppp-RNA bzw. poly(I:C) eine immunstimulatorische Antwort in HCC-Zellen auszulösen vermag. Hierzu wurde das durch RLH-Aktivierung induzierte Typ I IFN mittels qRT-PCR ermittelt.

Murine Hepa 1-6 und humane Hep3B Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen poly(I:C), 5'ppp-RNA bzw. den entsprechenden Konzentrationen an Kontroll-RNA (OH-RNA) transfiziert. Nach 22 Stunden wurde die IFN- β mRNA-Expression in Bezug zum Referenz-Gen β -Actin bestimmt.

Wie in Abbildung 12 gezeigt, fand sich in Zellen, die mit 5'ppp-RNA stimuliert wurden, dosisabhängig eine Hochregulation der IFN- β mRNA-Expression. Auch die Behandlung mit

poly(I:C) führte zu einer signifikanten IFN- β mRNA-Induktion. Diese Beobachtungen lassen auf einen intakten RIG-I-Signalweg in den untersuchten HCC-Zellen schließen.

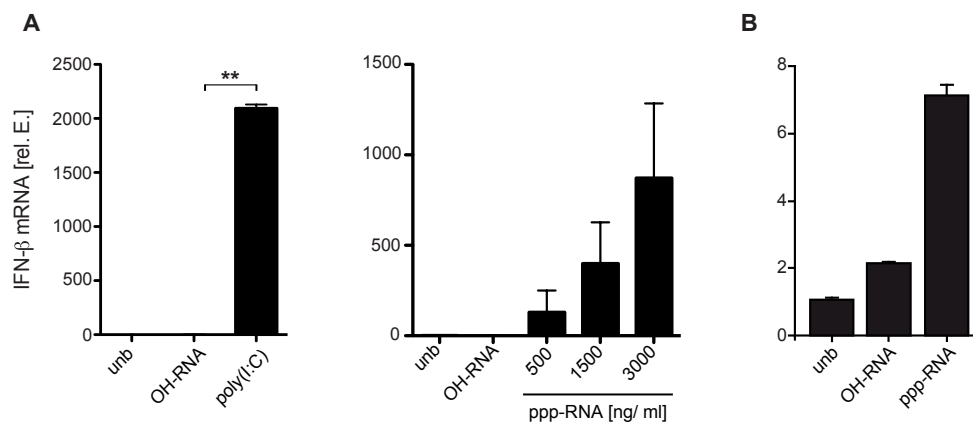


Abbildung 12: Transfektion von Hepa 1-6 (A) und Hep3B (B) Zellen mit RLH-Liganden führt zur Hochregulation der IFN- β -Expression.

22 h nach Transfektion der Zellen mit poly(I:C) (250 ng/ml) bzw. 5'ppp-RNA (500 ng/ml, 1500 ng/ml, 3000 ng/ml) wurde in den Tumorzellen die Expression von IFN- β mRNA mittels qRT-PCR ermittelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte und mit OH-RNA behandelte Zellen, gezeigt in den jeweils höchsten Konzentrationen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus zwei unabhängigen Experimenten. ** $P < 0,01$.

3.2.3 RLH-Liganden induzieren die Produktion von CXCL10

Um zu ermitteln, ob nach Stimulation mit RLH-Liganden eine Interferonantwort auf Proteinebene erfolgte, wurde sezerniertes CXCL10 (auch bekannt als IP-10) im Überstand mittels ELISA gemessen. Tumorzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen poly(I:C), 5'ppp-RNA bzw. OH-RNA transfiziert.

Sowohl poly(I:C) als auch 5'ppp-RNA führten zu einer Sekretion von CXCL10 (Abbildung 13). Eine Konzentration von 500 ng/ml poly(I:C) führte zur maximalen CXCL10 Produktion in Hepa 1-6 Zellen. Höhere Konzentrationen waren weniger effektiv, wahrscheinlich aufgrund der verstärkten Zelltodausslösung (siehe Absatz 3.3). Hingegen zeigte eine 5'ppp-RNA Konzentration bis 3 μ g/ml eine dosisabhängige Zunahme der CXCL10 Sekretion.

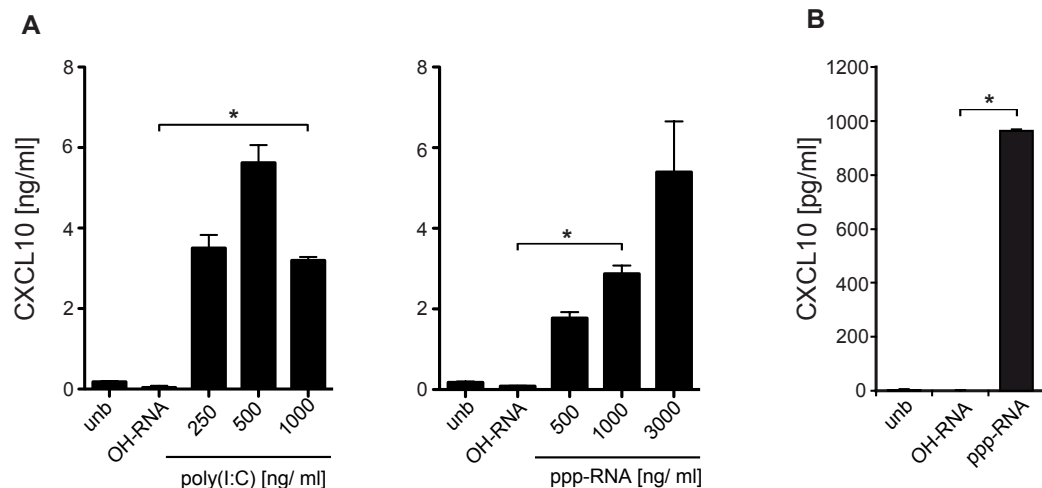


Abbildung 13: Produktion von CXCL10 in HCC-Zellen nach Stimulation mit RLH-Liganden. Hepa 1-6 Zellen (A) und Hep3B Zellen (B) wurden mit den angegebenen Mengen an poly(I:C), ppp-RNA oder Kontroll-RNA (OH-RNA) transfiziert. Dargestellt ist hier die OH-RNA mit der jeweils höchsten Konzentration. Hep3B Zellen wurden mit 1500 ng/ml ppp-RNA stimuliert. Gemessen wurde die CXCL10 Produktion im Überstand mittels ELISA nach 24 h. Gezeigt sind Mittelwerte + SD aus einem repräsentativen Experiment von insgesamt drei Wiederholungen. * $P < 0,05$

3.2.4 RLH-Liganden induzieren die Expression von RLH über einen positiven feedback loop

Die Aktivierung von RLH führt im Verlauf des Signalweges zu einer Signalverstärkung durch die Bildung von weiteren RLH. Zunächst sollte untersucht werden, ob der positive Feedbackmechanismus intakt ist, um Rückschlüsse auf einen funktionellen Signalweg in HCC-Zellen zu schließen.

Murine Hepa 1-6 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen poly(I:C), 5'ppp-RNA bzw. den entsprechenden Konzentrationen Kontroll-RNA (OH-RNA) transfiziert. Nach 22 Stunden wurde die mRNA-Expression von MDA5 und RIG-I mittels qRT-PCR ermittelt.

Tumorzellen, die mit den RLH-Liganden stimuliert wurden, zeigten eine Hochregulation von RIG-I und MDA5 (Abbildung 14). Dieser Effekt war dosisabhängig. Bei poly(I:C) Konzentrationen über 250 ng/ml nahm die Expression wieder ab (nicht gezeigt). Eine Erklärung hierfür ist die Toxizität höherer poly(I:C)-Konzentrationen, die Apoptose auslösen.

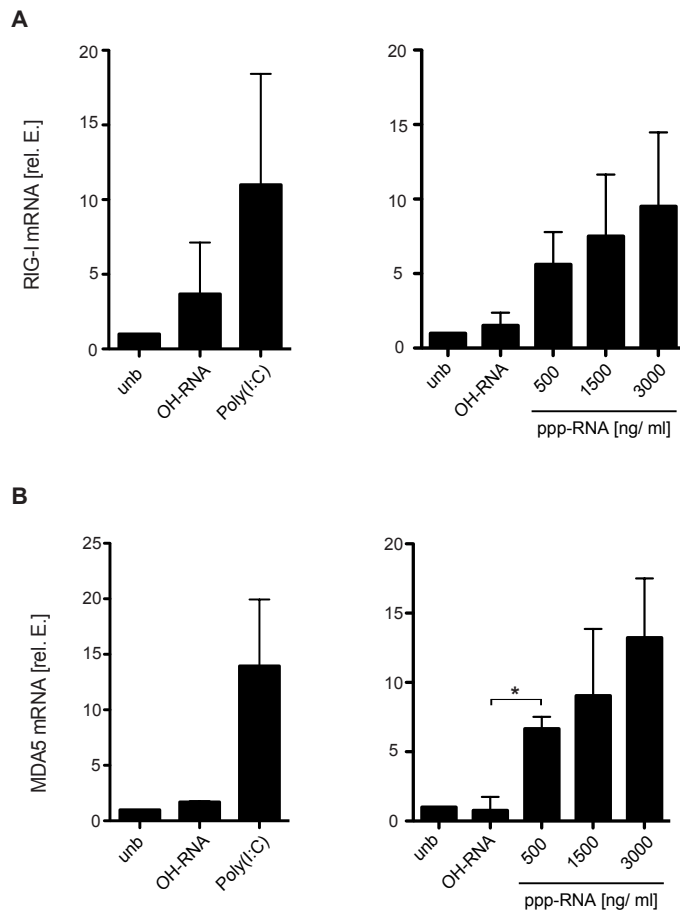


Abbildung 14: Transfektion von Hepa 1-6 Zellen mit RLH-Liganden führt zur vermehrten Expression von RIG-I (A) und MDA5 (B).

22 h nach Transfektion von Hepa 1-6 Zellen mit poly(I:C) (250ng/ml) bzw. 5'ppp-RNA (500 ng/ml, 1500 ng/ml und 3000 ng/ml) wurde in den Tumorzellen die Expression von RIG-I (A) und MDA5 (B) mRNA mittels qRT-PCR bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie mit OH-RNA behandelte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus zwei unabhängigen Experimenten. * $P < 0,05$.

Um die RLH-Liganden-vermittelte Induzierbarkeit von RIG-I zu bewerten, wurde die Expression in HCC-Zelllinien zudem mittels Western Blot untersucht. Sowohl in den murinen Hepa 1-6 Zellen, als auch in den humanen Hep3B Zellen ließ sich eine Liganden-induzierte RIG-I-Expression mittels 5'ppp-RNA detektieren (Abbildung 15). Als Positiv-Kontrolle diente die Stimulation mit exogenem IFN- α . Dies lässt auf einen positiven Regelkreis schließen.

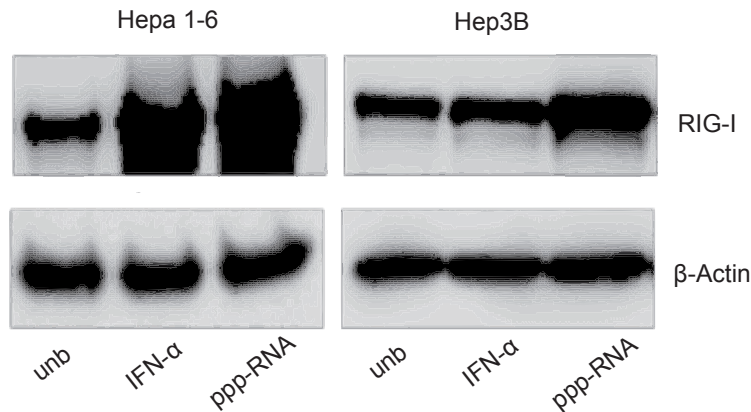


Abbildung 15: RLH-Liganden sowie Stimulation mit IFN- α induziert in HCC-Zellen eine Hochregulation der RIG-I-Expression.

Murine Hepa 1-6 und humane Hep3B Zelllinien wurden mit 1 μ g/ml 5'ppp-RNA transfiziert bzw. mit 100 U/ml IFN- α stimuliert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Tumorzellen. Nach 24 h wurde die RIG-I-Expression in Zelllysaten mittels Western Blot nachgewiesen. Ein Teil der Daten wurde bereits in Abb. 2 gezeigt. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.3 Aktivierung des RLH-Signalweges löst in HCC-Zellen Zelltod aus

Als nächstes galt es die Frage zu klären, ob durch die Aktivierung des RIG-I-Signalweges in HCC-Zellen Zelltod ausgelöst werden kann. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass eine RLH-Aktivierung in Melanom- sowie Pankreaskarzinom-Zellen über den Caspase-9-abhängigen intrinsischen Apoptoseweg zum Zelltod der Karzinomzellen führt.^{70, 86} Nun sollte die Induktion des Zelltods durch RLH-Liganden für HCC-Zellen untersucht werden.

Hierfür wurden humane und murine HCC-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen poly(I:C) (31 bis 500 ng/ml), ppp-RNA (250 bis 1500 ng/ml) bzw. OH-RNA (jeweils in der höchsten Konzentration) behandelt. Um die Vitalität der Karzinomzellen zu überprüfen, wurde eine Färbung mit Annexin V/ PI durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert. Zellen behandelt mit poly(I:C) wurden nach 24 Stunden und mit 5'ppp-RNA nach 48 Stunden untersucht.

Bei den mit poly(I:C) behandelten Zellen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Vitalität. Bei einer Konzentration von 250 ng/ml waren nur noch 30 % der murinen Hepa 1-6 Zellen und 10 % der humanen Hep3B Zellen vital. Auch die Behandlung mit 5'ppp-RNA führte sowohl bei Hep3B Zellen als auch Hepa 1-6 zu einer Abnahme der Vitalität. Für die Behandlung beider Karzinomzelllinien wurde bei einer Konzentration von 500 ng/ml eine Senkung der Vitalität auf weniger als 40 % beobachtet.

Eine gewisse Toxizität wurde auch nach Transfektion mit unmodifizierter OH-RNA beobachtet. Jedoch führte die Behandlung mit den RLH-Liganden zu einer signifikant stärkeren Zelltod-Induktion. Die Ergebnisse wurden durch einen *CellTiter Blue Viability Assays*[®] bestätigt (Daten nicht gezeigt).

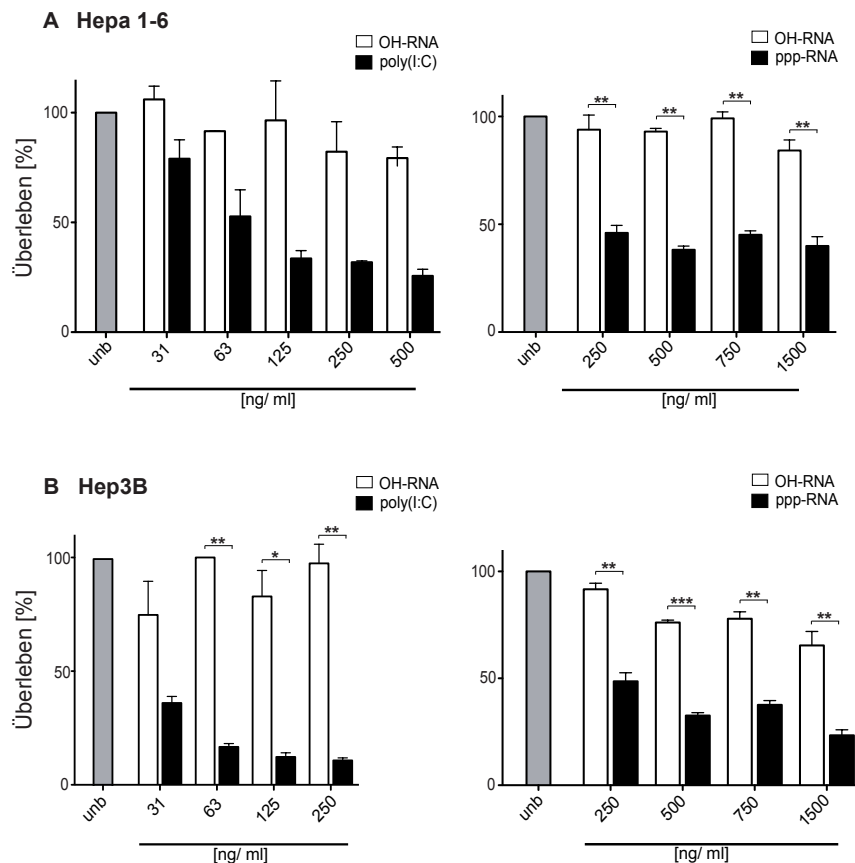


Abbildung 16: RLH-Liganden-induzierter Zelltod in Hepa 1-6 (A) und Hep3B (B) Zellen.

HCC-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen poly(I:C), 5'ppp-RNA bzw. Kontroll-RNA (OH-RNA) transfiziert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte für poly(I:C) nach 24 h und für 5'ppp-RNA nach 48 h. Zur Detektion des Zelltodes wurden die Zellen mit Annexin V-APC und PI gefärbt. Dargestellt sind der prozentuale Anteil der vitalen Zellen (Annexin-/ PI- Zellpopulation relativ zur unbehandelten Kontrolle). Gezeigt sind repräsentative Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD aus Triplikaten. * P < 0,05. ** P < 0,01. *** P < 0,001.

3.4 Kombination aus siRNA gegen Polo-like-Kinase 1 und RLH-Liganden

Als Zielstruktur der siRNA-vermittelten Genexpressionshemmung wurde PLK-1 gewählt, eine im HCC häufig überexprimierte Kinase. PLK-1 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Ihr Ausschalten führt in den betroffenen Zellen zu einem Arrest in der G2 Phase und konsekutiv zum Absterben der Zelle.⁹³

3.4.1 siRNA-vermittelte Expressionshemmung von PLK-1

Zunächst stellte sich die Frage, ob sich die Expression von PLK-1 in HCC-Zellen durch eine entsprechende siRNA hemmen lässt und welche funktionellen Folgen sich daraus ergeben. Drei verschiedene gegen PLK-1 gerichtete siRNA wurden evaluiert. Zunächst wurden humane Hep3B Zellen je zwei Mal mit der siRNA transfiziert und die Expression mittels qRT-PCR nach 24 Stunden analysiert. In folgenden Versuchen erfolgte die Transfektion aufgrund der Effektivität nur einmal.

Für zwei verschiedene siRNA (Sequenzen 1424 und 1550) gegen humanes PLK-1 fand sich eine effektive Genexpressionshemmung (Abbildung 17A). Bereits eine einmalige Transfektion mit 500 ng/ml siRNA genügte, um bei beiden Sequenzen eine Hemmung von über 80% zu bewirken (Abbildung 17B). In Abbildung 17C ist die Expressionshemmung in murinen Hepa 1-6 Zellen nach einmaliger siRNA Behandlung (500 ng/ml) mit drei verschiedenen siRNA (Sequenzen 699, 1341 bzw. 773) dargestellt. Hier lag die Effizienz der Genexpressionshemmung der Sequenzen 699 und 773 bei über 90%.

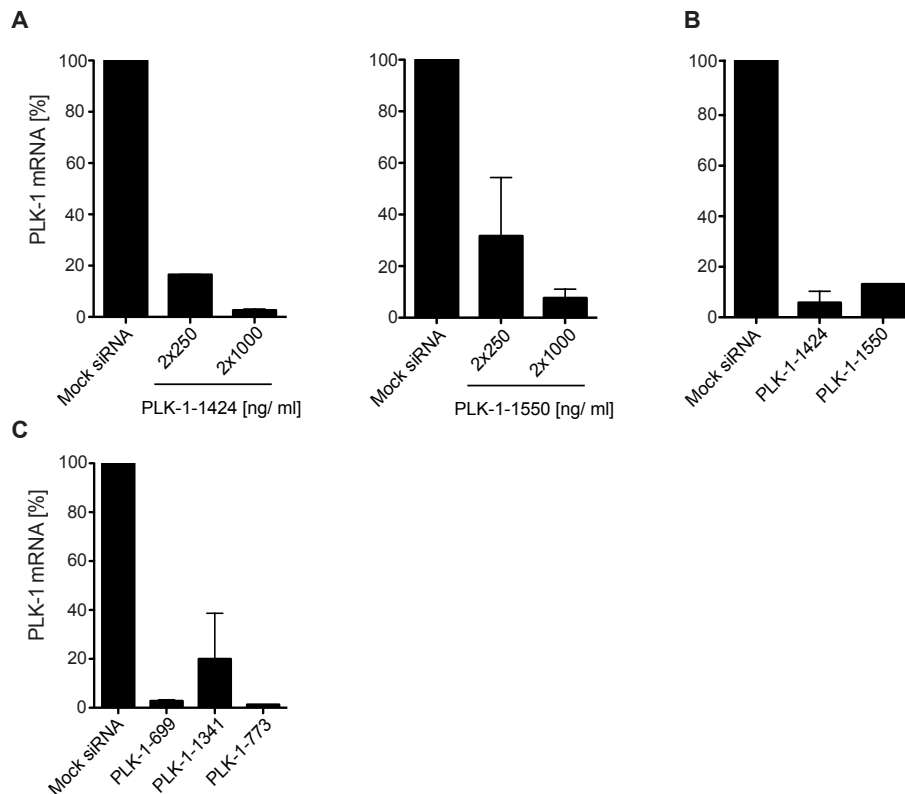


Abbildung 17: siRNA-vermittelte Genexpressionshemmung von PLK-1 in HCC-Zellen.

Hep3B (A+B) und Hepa 1-6 (C) Zellen wurden mit siRNA gegen PLK-1 transfiziert. Hierfür wurden die siRNA Sequenzen 1424 und 1550 für die humanen Hep3B Zellen und die Sequenzen 699, 1341 bzw. 773 für die murinen Hepa1-6 Zellen verwendet. (A) die Zellen wurden je zwei Mal mit den angegebenen siRNA Konzentrationen transfiziert, (B) im Vergleich zur einmaligen Transfektion. (B,C) Die einmalige Transfektion erfolgte mit 500 ng/ml siRNA bzw. Kontroll siRNA. Nach 24 h wurde die PLK-1 mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus zwei unabhängigen Versuchen.

3.4.2 PLK-1-Hemmung führt zu Zellzyklusarrest und Zelltod in HCC-Zellen

Es galt zu zeigen, dass die Hemmung von PLK-1 zu einem Arrest im Zellzyklus der Tumorzelle führt. Die Hemmung von PLK-1 induziert einen Stillstand in der G2 Phase des Zellzyklus.⁹³ Dies wurde für humane Hep3B Zellen durch eine durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse überprüft. Die Tumorzellen wurden hierfür mit der siRNA Sequenz 1424 transfiziert.

Der prozentuale Anteil der Zellen in der G2 Phase erhöhte sich dramatisch nach Hemmung von PLK-1. Wie in Abbildung 18 dargestellt, enthielten Zellen, die mit PLK-1 siRNA transfiziert wurden, einen Anteil von ca. 60 % an Zellen, die sich in der G2 Phase befanden, während bei der Kontroll-RNA der Anteil an Zellen in der G2 Phase bei ca. 15 % lag. Zellen in G1 Phase waren kaum nachweisbar. Dies deutet auf einen hocheffektiven Zellzyklusarrest hin. Ergänzend erfolgte eine Analyse der Viabilität der Tumorzellen mit dem CellTiter Blue[®]

Assay, sowie durchflusszytometrisch mittels Annexin V/ PI Färbung (Abbildung 19). Mit beiden Messmethoden konnte eine deutliche Reduktion der Viabilität von siRNA-behandelten Hep3B Zellen demonstriert werden. Murine Hepa 1-6 Zellen reagierten etwas weniger sensibel auf die PLK-1-Inhibition. Abbildung 19C zeigt, dass das Überleben von Hepa 1-6 Zellen 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA bei ca. 60 % lag.

Die Ergebnisse der Viabilitätsmessungen korrelieren mit denen der Zellzyklus-Analyse. Es lässt sich schlussfolgern, dass eine Hemmung von PLK-1 Tumorzelltod bewirkt. Für die Verwendung im kombinierten Therapieansatz wurde eine Konzentrationen von 250 ng/ml siRNA gewählt, da hier bereits ein Zyklusarrest zu beobachten war.

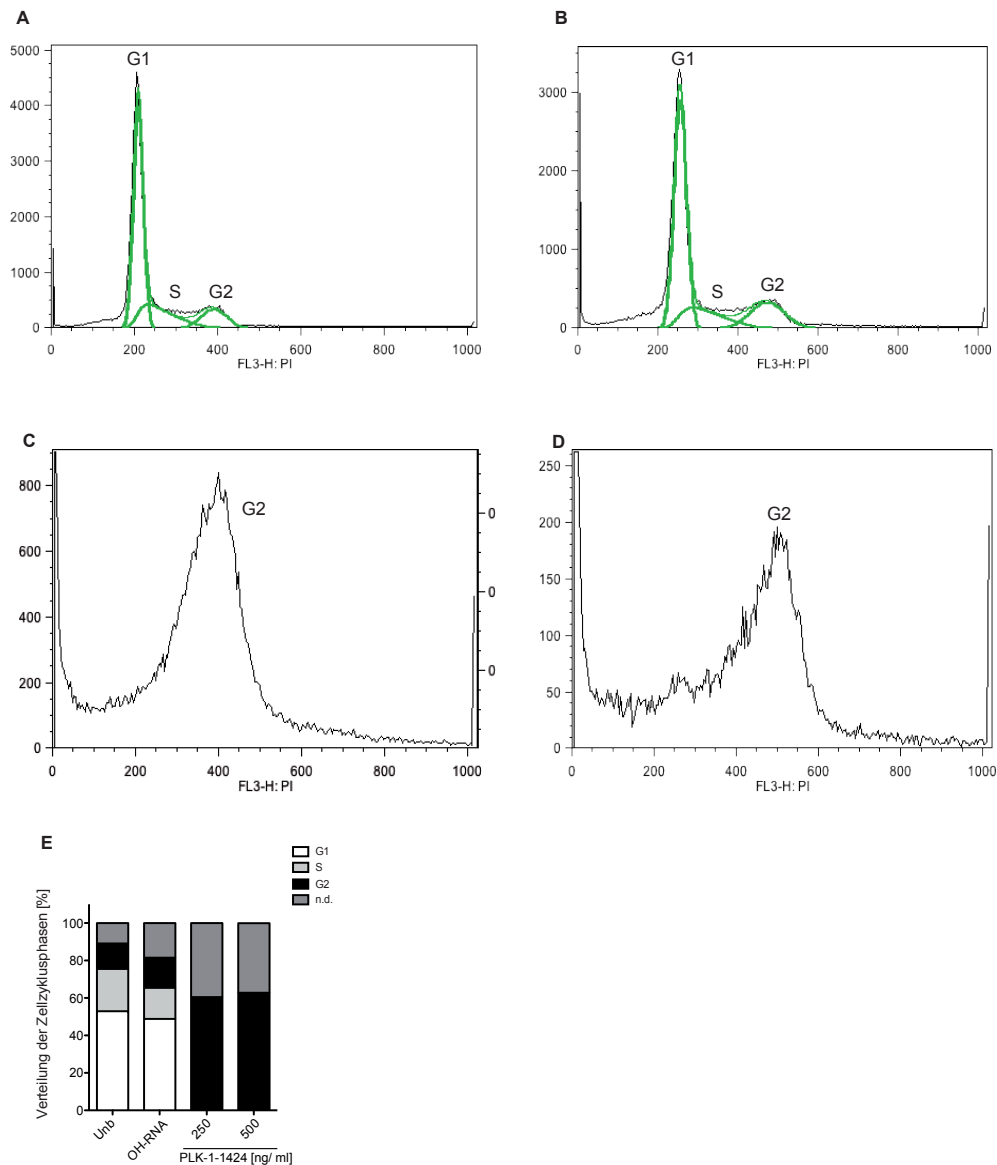


Abbildung 18: siRNA-vermittelte Genexpressionshemmung von PLK-1 führt zum Zyklusarrest in Hep3B Zellen. Hep3B Zellen wurden mit siRNA 1424 gegen PLK-1 und OH-RNA in den angegebenen Konzentrationen transfiziert und nach 48 h erfolgte eine durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse mit PI. Gezeigt sind (A) unbehandelte, (B) mit 500 ng/ml OH-RNA behandelte, (C) mit 250 ng/ml und (D) mit 500 ng/ml PLK-1 siRNA behandelte Zellen. (E) Prozentualer Anteil der verschiedenen Zyklusphasen. Hierbei wurde das Spektrum von 350 nm bis 600 nm als G2 Phase festgelegt. Dargestellt ist stellvertretend ein Experiment aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen.

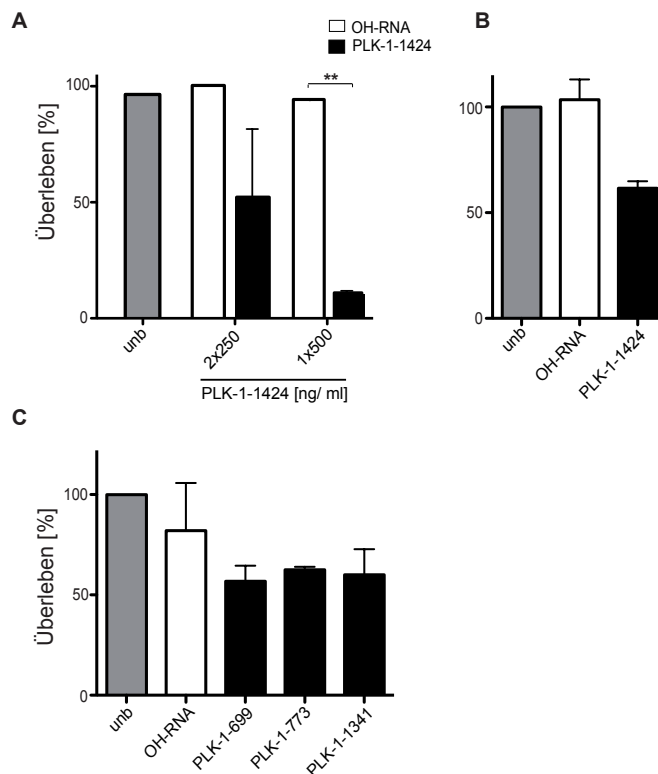


Abbildung 19: siRNA-vermittelte Hemmung von PLK-1 induziert Zelltod in humanen und murinen HCC-Zellen. (A) Hep3B und (C) Hepa 1-6 Zellen wurden mit siRNA gegen PLK-1 ein- bzw. zwei Mal transfiziert. Nach 72 h (A) und 48 h (B) wurde das Überleben der Zellen ermittelt. (A) Zur Detektion des Zelltodes wurden die Hep3B Zellen nach 72 h mit Annexin V-APC und PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Abgebildet sind der prozentuale Anteil der vitalen Zellen (Annexin-/ PI- Zellpopulation relativ zur unbehandelten Kontrolle). (B) Im Vergleich erfolgte die Zelltodanalyse der Hep3B Zellen nach 48 h mittels CellTiter Blue® Assay. Die Zellen wurden jeweils mit 500 ng/ml RNA behandelt. (C) Hepa 1-6 Zellen wurden mit 500 ng/ml der angegebenen siRNA Sequenzen bzw. OH-RNA transfiziert und ihre Vitalität nach 72 h mittels CellTiter Blue® Assay gemessen. Gezeigt sind repräsentative Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD aus Triplikaten. ** P < 0,01.

3.5 Kombination von RLH-Liganden und RNAi-vermittelter PLK-1-Inhibition

Zunächst wurde das Modell der bifunktionellen siRNA (kombinierte Eigenschaften in einem RNA-Molekül) durch eine gemeinsame Transfektion von poly(I:C) mit einer PLK-1 siRNA verdeutlicht. Die Kombination wurde verglichen mit den jeweils einzelnen Komponenten, mit OH-RNA und mit unbehandelten Zellen. Verwendet wurden humane Hep3B Zellen. 48

Stunden nach Behandlung erfolgte die Untersuchung der Zellviabilität mittels Annexin V/PI-Assay.

Die Zelltodrate der Hep3B Zellen war nach kombinierter Transfektion signifikant höher, im Vergleich zur Transfektion mit unmodifizierter OH-RNA bzw. PLK-1 siRNA (Abbildung 20). Allerdings löste bereits die alleinige Behandlung mit poly(I:C) eine hohe Zelltodrate aus, wodurch ein möglicher additiver Effekt von poly(I:C) und PLK-1 siRNA eventuell maskiert wurde. Wie vorherige Versuche zeigten, ist poly(I:C) bereits nach 24 Stunden ein potenter Zelltodinduktor (Vgl. Abb. 16).

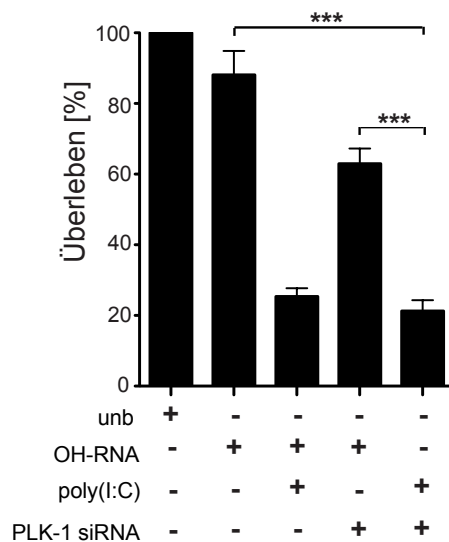


Abbildung 20: Zelltod durch Kombination von poly(I:C) mit PLK-1 siRNA in Hep3B Zellen. Hep3B Zellen wurden mit der angegebenen RNA transfiziert. Es wurden 15 ng/ml poly(I:C) und 250 ng/ml PLK-1 siRNA benutzt. Nach 48 h wurde mittels Annexin V/PI-Färbung das Überleben der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD aus Triplikaten. *** P < 0,001. Repräsentativ sind Daten aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Als nächstes wurde das Therapiekonzept mit einer Kombination aus 5'ppp-RNA und PLK-1 siRNA untersucht. Es wurden auch bei diesem Versuch die Komponenten einzeln transfiziert. Hepa 1-6 und Hep3B Zellen wurden mit der Kombination aus 5'ppp-RNA und siRNA, mit 5'ppp-RNA und OH-RNA, mit siRNA und OH-RNA und als Kontrolle mit OH-RNA behandelt. Nach 48 Stunden erfolgte die Analyse der Viabilität mittels Annexin V/ PI Assay.

Die Zelltodrate beider HCC-Zelllinien war durch Kombination von 5'ppp-RNA und PLK-1 siRNA am höchsten, was auf einen additiven Effekt hindeutet (Abbildung 21). Dies galt

sowohl in humanen als auch murinen HCC-Zellen. Die Transfektion der einzelnen Komponenten (ppp-siRNA bzw. PLK-1 siRNA) war diesbezüglich jeweils unterlegen.

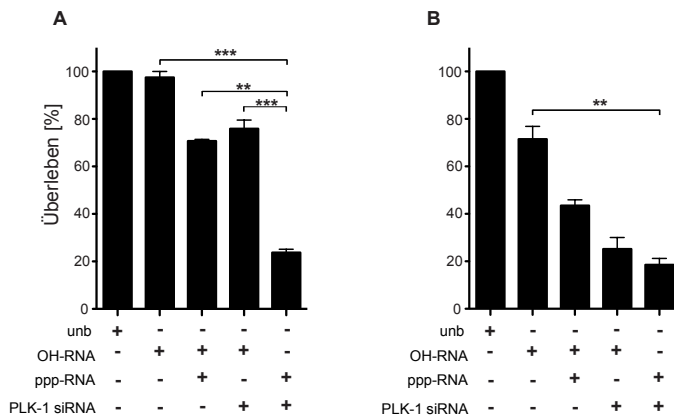


Abbildung 21: Induktion von Zelltod in HCC-Zellen durch Kombination aus siRNA-vermittelter PLK-1 Hemmung und RIG-I-Aktivierung. Hepa 1-6 (A) und Hep3B Zellen (B) wurden mit ppp-RNA (500 ng/ml) und OH-RNA, mit PLK-1 siRNA 1424 (250 ng/ml) plus OH-RNA und mit der Kombination aus ppp-RNA und PLK-1 siRNA 1424 transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte und mit 750 ng/ml OH-RNA behandelte Zellen. Zur Detektion des Zelltodes wurden die Zellen nach 48 h mit Annexin V/PI gefärbt und die Viabilität durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind der prozentuale Anteil der lebenden Zellen (Annexin- und PI-Zellpopulation der behandelten Zellen in Bezug zur unbehandelten Kontrolle). Angezeigt sind Mittelwerte + SD von Duplikaten eines repräsentativen Versuchs von insgesamt drei unabhängigen Experimenten. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$.

Es stellte sich nun die Frage, ob der immunstimulatorische Effekt bei kombinierter Transfektion von 5'ppp-RNA und PLK-1 siRNA erhalten bleibt. Hierzu wurde CXCL10 in den Zellkulturen mittels ELISA bestimmt. Hepa 1-6 Zellen produzieren sowohl nach Behandlung mit 5'ppp-RNA als auch nach Behandlung mit der Kombination aus 5'ppp-RNA und PLK-1 siRNA ähnliche Level an CXCL10 (Abbildung 22). Dies war nicht der Fall nach Behandlung mit OH-RNA oder PLK-1 siRNA. Somit bleibt der RIG-I aktivierende Effekt in der Kombination bestehen.

Zusammengefasst zeigen die Experimente, dass die Kombination aus RLH-Aktivierung und PLK-1-Hemmung additiv Tumorzelltod bei HCC-Zellen auslöst und zudem zu einer IFN-getragenen Immunantwort führt. Die Entwicklung und *in vivo* Evaluation bifunktioneller 5'ppp-siRNA-Moleküle, die beide Eigenschaften in einem RNA-Molekül vereinen, sind Gegenstand aktueller Untersuchungen in der Arbeitsgruppe.

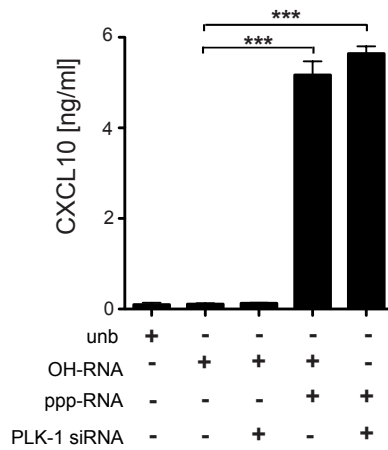


Abbildung 22: Sekretion von CXCL10 nach kombinierter Transfektion von ppp-RNA und PLK-1 siRNA. Hepa1-6 Zellen wurden mit ppp-RNA (500 ng/ml) und OH-RNA (250 ng/ml), mit PLK-1 siRNA (250 ng/ml) und OH-RNA (500 ng/ml) und mit der Kombination aus ppp-RNA (500 ng/ml) und PLK-1 siRNA (250 ng/ml) transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie mit 750 ng/ml OH-RNA behandelte Zellen. Die Produktion von CXCL10 wurde nach 24 h im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus Duplikaten eines repräsentativen Experimentes. *** P < 0,001.

4. Diskussion

4.1 RLH als molekulare Zielstruktur einer Immuntherapie beim HCC

Das fortgeschrittene HCC hat eine schlechte Prognose und aktuelle Therapiemöglichkeiten sind limitiert. Erste Ergebnisse mit Immuncheckpoint-Inhibitoren geben Hoffnung, dass durch das Immunsystem eine effektive Tumorstromskontrolle im HCC erzielt werden kann (CA209-040 trial).¹⁰¹ Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel zu bestimmen, ob die Aktivierung der zytosolischen Helikase RIG-I durch synthetisch generierte 5'ppp-RNA-Moleküle in HCC-Zellen zu einer IFN-getragenen Immunantwort sowie zu Zelltod führt. Zudem sollte evaluiert werden, ob die Inhibition des Zellzyklusregulators PLK-1 mittels siRNA zu einem G2-Arrest und konsekutiv Zelltod führt. Schließlich sollte untersucht werden, ob RIG-I-Aktivierung und PLK-1-Hemmung additive Effekte bezüglich Zelltodinduktion ausüben. Eine bifunktionelle ppp-siRNA gegen PLK-1, die beide Eigenschaften in einem RNA-Molekül vereint, könnte ein innovativer Therapieansatz in der Immuntherapie des HCC darstellen.

Unsere Arbeitsgruppe hat in vorausgegangenen Arbeiten RIG-I als molekulare Zielstruktur für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms identifiziert. In dieser Arbeit wurde RIG-I im Hinblick auf eine Therapiemöglichkeit des HCC untersucht. Fundamental für diese Arbeit war die Erkenntnis, dass RIG-I zytosolische 5'ppp-RNA erkennt und nach Signalinitiierung eine IFN-getragene Immunantwort sowie Zelltod auslöst.^{50, 57, 51} Interessant für die Tumorthherapie ist, dass RLH nahezu ubiquitär exprimiert werden und somit auch in Tumorzellen vorkommen, ganz im Gegensatz zu den TLR. Zahlreiche immunaktivierende Substanzen wurden erforscht, die an der Zelloberfläche exponierte oder lysosomale Rezeptoren, wie TLR, stimulieren. Zytosolische PRR in der Tumorummuntherapie zu nutzen ist ein neuer Ansatz. Die antivirale Immunantwort, die über Typ I IFN und andere proinflammatorische Zytokine vermittelt wird, ist ein weiterer vielversprechender Vorteil, den RLH bieten und der in der Krebstherapie genutzt werden kann.¹⁰² Typ-I IFN spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Immunüberwachung von Tumoren.⁶⁹ Beispielsweise hemmt Typ-I IFN die immunsuppressiven Effekte von regulatorischen T-Zellen und von myeloiden Suppressorzellen. Außerdem fördert IFN die Antwort von T_H1-Zellen.^{103, 104} Präklinische Studien zeigen erfolgreiche Anwendungen von RLH-Liganden in Tumormodellen und belegen, dass durch die RIG-I-Aktivierung mittels 5'ppp-RNA in Melanom-, Ovarial- und Pankreaskarzinomzellen Zelltod ausgelöst wird.^{70, 105, 106} Unsere

Arbeitsgruppe konnte für das Pankreaskarzinom einen therapeutischen Effekt durch die Aktivierung von RIG-I zeigen. *In vivo* konnte der Effekt durch eine Kombination von RIG-I-Aktivierung mit RNA-Interferenz mittels TGF- β gerichteter ppp-siRNA deutlich verbessert werden.⁸⁶ Synthetisch hergestellte ppp-siRNA stellen somit potenziell hoch effektive und versatile onkologische Medikamente dar, die zielgerichtete Therapien mit Immuntherapie zusammenbringen.

4.2 Expression von RIG-I in humanem HCC-Gewebe und HCC-Zelllinien

Als wichtige Grundlage für diese Arbeit ließ sich in Biopsien aus Gewebe von humanen HCC in allen untersuchten Proben die Expression von RIG-I nachweisen. 20 % der Proben färbten sich schwach, 60 % mäßig und 20 % stark positiv für RIG-I. Im Vergleich hierzu wurden in der Datenbank des *human protein atlas* Gewebe von 6 Lebertumoren auf RIG-I untersucht, wovon ca. 50 % schwach, 17 % mäßig und 17 % stark positiv für RIG-I waren. In 17 % der Proben konnte RIG-I nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen korrelieren nicht ganz mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wobei die Untersuchung der Datenbank von 6 Tumorproben statistisch nicht sehr überzeugend ist. Interessanterweise zeigen einige Arbeiten, dass die Expression von RIG-I im Gewebe von HCC-Tumoren herunterreguliert ist. Die Studie von Zhikui Liu et al. sei hervorzuheben. Sie untersuchte 80 HCC-Gewebeproben auf RIG-I mRNA Expression und verglich die Expressionslevel mit denen von tumorfreiem Lebergewebe. Die mRNA-Expression lag unter 40 % im Tumorgewebe, während in ca. 80% des tumorfreien Lebergewebes RIG-I mRNA exprimiert wurde. Immunhistochemische Färbungen wiesen RIG-I ebenfalls zu 85 % im gesunden Lebergewebe und zu 40 % im Tumorgewebe nach.¹⁰⁷ Die Arbeit von Jin Hou et al. stellte ebenso fest, dass die Expression von RIG-I im HCC-Gewebe herunterreguliert wird und diskutiert RIG-I als möglichen Prognosemarker, und um zu identifizieren, welche Patienten auf eine IFN- α Therapie ansprechen. Eine mögliche Erklärung für die diskrepanten Befunde sind technische Unterschiede bei der Immunhistochemie bzw. Unterschiede im Patientenkollektiv, da bei oben genannter Studie asiatische Patienten analysiert wurden, bei denen die Virushepatitis B als Ursache für die HCC-Entstehung überwiegt.

In der vorliegenden Arbeit konnte ferner demonstriert werden, dass humane und murine HCC-Zelllinien RIG-I exprimieren. Die Expression konnte durch Stimulation mit IFN- α

hochreguliert werden, was auf einen intakten IFN-RLH-*feedback loop* hinweist. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für Pankreaskarzinomzellen beschrieben. Auch hier ließ sich die zytosolische Expression von RIG-I in 10 von 10 untersuchten Proben aus primären Pankreaskarzinomen und Metastasen immunhistochemisch nachweisen. Ferner wurde die RIG-I Expression mittels qRT-PCR und Western blot in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien gezeigt. Eine Behandlung mit RIG-I-Liganden induzierte die Sekretion von CXCL10 und IFN- β , was auf einen intakten RIG-I-Signalweg schließen lässt. Um zu zeigen, dass diese Effekte RIG-I-vermittelt waren, behandelte unsere Arbeitsgruppe PANC-1 Zellen vor 5'ppp-RNA-Stimulation mit siRNA gegen RIG-I. In diesen Zellen ließ sich eine stark verminderte Phosphorylierung von IRF3, sowie verminderte CXCL10 Sekretion nachweisen.⁸⁶ Die Übereinstimmung der Beobachtungen für Pankreaskarzinomzellen lässt auf einen ähnlich intakten RIG-I-Regelkreis in HCC-Zellen schließen.

4.3 Immunstimulatorische Effekte nach RLH-Aktivierung

Die Aktivierung von RIG-I initiiert eine Signalkaskade, die über die Transkriptionsfaktoren IRF3, IRF7 und NF κ B zu einer antiviralen Immunantwort führt, welche durch die Produktion von Typ I IFN und anderen Faktoren der angeborenen Immunabwehr charakterisiert ist.⁵⁶ In präklinischen Arbeiten zum Melanom, Pankreaskarzinom und Ovarialkarzinom wurde funktionelles RLH-*Signaling* in Tumorzellen demonstriert.^{70, 72, 86, 105, 108} Im Zentrum steht die Typ I IFN-getragene Immunantwort, die sowohl das angeborene als auch adaptive Immunsystem aktiviert.⁵⁶ Für HepG2 Zellen konnte bereits nachgewiesen werden, dass es durch Behandlung mit 5'ppp-RNA zu einer IFN Typ I-vermittelten Immunantwort kommt.¹⁰⁹

Die vorliegende Arbeit bestätigt die proimmunogenen Effekte durch RLH-Aktivierung für weitere humane und murine HCC-Zellen. Transfektion mit RLH-Liganden führte zur Phosphorylierung von IRF3 sowie zur IFN- β Produktion.

Neben RIG-I stellt auch MDA5 durch seine Aktivierung des IFN Typ I Signalweges eine interessante Zielstruktur für die Immuntherapie dar.^{70, 110} Somit kommen auch synthetische Liganden von MDA5, wie poly(I:C), als potentielle Kandidaten für eine Tumorummuntherapie in Frage.⁵⁷ Diese Arbeit konnte zeigen, dass es nach Behandlung mit

dem MDA5 Liganden poly(I:C) in HCC-Zellen zu einem hoch signifikant gesteigerten Expressionslevel an IFN- β mRNA kommt. Zudem wurde die Sekretion des Chemokins CXCL10 nach Aktivierung von RIG-I und MDA5 in Tumorzellen beobachtet.^{70, 72, 110} CXCL10 ist der Ligand des Chemokinrezeptors CXCR3, der die Migration von T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und DC steuert.¹¹¹ In der Tat korrelierten erhöhte CXCL10 Spiegel in reseziertem HCC-Gewebe von 172 Patienten mit einer vermehrten Infiltration der Tumore mit T_H1-, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen.¹¹² Sowohl eine RIG-I-, als auch MDA5-induzierte CXCL10 Produktion, ließ sich in dieser Arbeit in humanen und murinen HCC-Zellen nachweisen.

4.4 RLH-Liganden-vermittelte Induktion von Zelltod in HCC-Zellen

Durch die Transfektion von RLH-Liganden wurde bei HCC-Zellen effizient und dosisabhängig Zelltod ausgelöst. Unsere Arbeitsgruppe konnte für Pankreaskarzinomzellen mittels Annexin/PI-Färbung, Nachweis von aktivierter Caspase-9 und Spaltung von PARP, einer primären Zielstruktur der Effektor-Caspase-3, zeigen, dass der RIG-I-vermittelte Zelltod der intrinsischen Form der Apoptose entspricht.¹¹³ Unterstützt werden diese Ergebnisse von anderen Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass RLH-Liganden eine proapoptotische Signalkaskade über die proapoptotischen BH3-*only* Proteine Puma und Noxa hervorrufen.^{70, 86, 106} Andere Arbeiten wiederum zeigten eine Beteiligung von LC3-abhängiger Autophagie beim MDA5-vermittelten Tumorzelltod im Melanom.⁷¹ Auch unsere Arbeitsgruppe konnte eine Beteiligung von Autophagie an dem RLH-indizierten Untergang von Pankreaskarzinomzellen bestätigen.¹¹³ In der vorliegenden Arbeit bleibt die Frage offen, zu welchem Teil der RIG-I-vermittelte Zelltod bei den HCC-Zellen durch Apoptose und zu welchem Teil durch Autophagie verursacht wird. Die exakte Analyse der Form des Zelltodes ist Gegenstand aktueller Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe.

Die Studie von Besch et al. beschreibt, dass das anti-apoptotische Protein Bcl-xL in Melanomzellen eine besondere Rolle spielt, da es gesunde Melanomzellen vor RIG-I-induziertem Zelltod bewahren kann.⁷⁰ Unsere Arbeitsgruppe konnte im Pankreastumormodell *in vivo* nachweisen, dass die Einleitung der Apoptose nach 5'ppp-RNA Administration auf den Tumor begrenzt blieb, während tumorfreies Pankreasgewebe, Lunge, Nieren und Leber der Mäuse histopathologisch unauffällig waren.⁸⁶ Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten,

dass der RIG-I-vermittelte Effekt der Zelltodinduktion auf Tumorzellen begrenzt ist. Ferner zeigte sich, dass der antitumorale Effekt *in vivo* abhängig von CD8⁺ T-Zellen ist.^{86, 114} Diese immunologisch-vermittelte Tumorspezifität stellt einen Vorteil von RLH-Liganden im Vergleich zu konventionellen Chemotherapeutika dar.¹⁰⁶ In der vorliegenden Arbeit zeigten die humanen Hep3B sowie die murinen Hepa 1-6 Zellen eine hohe Sensitivität mit deutlichem Anstieg der Apoptoserate nach Transfektion mit 5'ppp-RNA oder poly(I:C). Jedoch lässt sich feststellen, dass auch bei einem Teil der Zellen, die mit OH-RNA behandelt wurden, Zelltod ausgelöst wurde. Dies könnte auf die Toxizität des Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX zurückzuführen sein. Vor allem für *in vivo* Anwendungen stellt es eine wichtige Anforderung dar, das geeignete Transfektionsagens zu finden, welches das RNA-Molekül an den gewünschten Ort im Tumorgewebe bringt und zugleich möglichst wenig toxisch auf das umgebende Gewebe wirkt. Hierauf wird später noch detaillierter eingegangen.

4.5 RNA-Interferenz als Therapiestrategie im HCC

Ein anderer wichtiger Mechanismus, den Zellen bei der Virusabwehr nutzen, ist die RNA-Interferenz (RNAi), die Sequenz-spezifische Degradierung viraler RNA. Dieser Mechanismus lässt sich durch ein siRNA Molekül imitieren, durch das gezielt ein beliebiges Gen ausgeschaltet werden kann.¹¹⁵ RNAi hat in den letzten Jahren in der Krebstherapie viel Aufmerksamkeit erhalten, da hierdurch gezielt bestimmte Krebs-fördernde Gene ausgeschaltet werden können.⁸⁰ Da die Leber eines der am besten untersuchten Organe ist, was die Applikation der siRNA-Moleküle anbelangt, war das HCC unter den ersten Tumoren die mit siRNA gegen onkogene Sequenzen behandelt wurden.^{84, 85, 83} In dieser Arbeit entschieden wir uns für die Genexpressionshemmung des Zellzyklusregulator PLK-1 mittels siRNA und konnten einen effizienten *Knockdown* auf mRNA Ebene nachweisen. Die Studie von Judge et al. identifizierte die siRNA Sequenzen PLK-1-1424 bei humanen und PLK-1-773 bei murinen Zelllinien als potente Nukleotidsequenzen und zeigte eine effektive Genexpressionshemmung von PLK-1 in Hep3B Zellen. In dieser Arbeit erwiesen sich diese Sequenzen ebenfalls als effektiv.

Es existieren noch eine Reihe anderer RNAi-basierter Therapiestrategien beim HCC, die auf eine Vielzahl anderer Gene, wie dem Oncoprotein p28GANK oder Urokinase-typ

Plasminogen Activator uPA gerichtet sind.^{83, 84, 85} In anderen Arbeiten wurde das Kinesin Spindle Protein (KSP) herunterreguliert, was eine ähnliche Funktion wie PLK-1, in der Teilung und Bildung des Spindelapparates während der Mitose hat. Es gibt zahlreiche Chemotherapeutika, die ähnliche Wirkmechanismen aufweisen. Durch die lokal begrenzte Anwendung der RNAi können starke Nebenwirkungen klassischer Chemotherapeutika wie Myelosuppression oder Neutropenie vermieden werden.¹¹⁶ Alnylam Pharmaceuticals startete beispielsweise klinische Versuche mit KSP-RNAi an Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren. Post-therapeutische Biopsien ergaben pharmakologisch relevante Konzentrationen an siRNA in den Tumorgeweben. Von insgesamt 27 Patienten hatten aus der Gruppe, die geringere Mengen an siRNA erhielten (< 0,4 mg/kg) 8,3 % (1 von 12) für 2 Monate ein stabiles Krankheitsbild im Vergleich zu 46,6 % (7/15) aus der Gruppe mit > 0,7 mg/kg KSP-siRNA.¹¹⁷ Eine andere Studie konnte ebenso erfolgreich RNAi an Melanompatienten nachweisen und zeigen, dass siRNA mittels Nanopartikel in das Tumorgewebe transportiert wurde.¹¹⁸ Die siRNA kann aber nicht nur systemisch, sondern auch lokal in bestimmte Tumorarten wie Kopf- und Halstumoren appliziert werden.¹¹⁶

Im Vergleich zu direkten Inhibitoren wirkt RNAi viel spezifischer. So hemmt der PLK-1-Inhibitor nicht nur PLK-1, sondern auch die Familienmitglieder PLK-2 und PLK-3, was zu entgegengesetzten Effekten bei der Zellteilung führen kann.⁸³ Ein weiterer Vorteil stellt die Dauer der therapeutischen Wirkung der siRNA-Behandlung dar. Ist die RNAi einmal in der Zelle eingeführt, kann *gene silencing* für viele Tage bestehen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die aktive RISC-vermittelte Spaltung der Ziel mRNA nach einmaliger siRNA-Behandlung für 7 bis 10 Tage bestehen bleibt.⁸³

4.6 Evaluation von PLK-1 als Zielstruktur für die RNAi

Wir entschieden uns für die Hemmung von PLK-1 durch RNAi. PLK-1 spielt eine Schlüsselrolle im Zellzyklus und ist häufig in humanem HCC überexprimiert.^{93, 99} Die Hemmung des Zellzyklus hat sich bei Chemotherapeutika wie den Taxanen oder Vinca-Alkaloiden in der Krebstherapie erfolgreich bewährt. Durch die Therapie der PLK-1 Inhibition speziell in Tumorzellen könnten die starken Nebenwirkungen der Chemotherapeutika umgangen werden. Darüber hinaus wurde bereits eine vielversprechende Hemmung von PLK-1 mittels *short hairpin* RNA in *xenograft* HCC-Mausmodellen erzielt.¹¹⁹

Für gesunde Pankreaszellen konnte gezeigt werden, dass die Transfektion mit PLK-1 siRNA keinen signifikanten Effekt auf den Zellzyklus und die Proliferation der gesunden Zellen auslöst. Dies deutet darauf hin, dass PLK-1 für Tumorzellen überlebenswichtig ist, nicht-entartete Zellen hingegen scheinen den Verlust von PLK-1 entbehren zu können.¹²⁰ In dieser Arbeit konnten wir durch PLK-1-Hemmung eine vermehrte Zelltodrate bei humanen und murinen HCC-Zellen nachweisen. Des Weiteren beobachteten wir in Hep3B Zellen einen Zellzyklusarrest in der G2/M Phase. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Arbeiten.^{90, 121, 122, 123} Die Hemmung von PLK-1 wurde auch bei anderen Tumorarten untersucht und lieferte erfolgreiche Ergebnisse, beispielsweise im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom¹²⁴, im Pankreaskarzinom¹²⁵ oder dem Ösophaguskarzinom.¹²⁶ Der potente und selektive PLK-1-Inhibitor Volasertib erzielte vor allem bei der AML vielversprechende Ergebnisse und wird diesbezüglich in Phase III Studien getestet.¹²⁷ Außerdem gibt es weitere spannende klinische Studien mit Volasertib an Patienten mit soliden Tumoren.^{128, 129} Ähnliche Studien testen den Inhibitor auch in Kombination mit anderen Therapieformen, wie der Strahlentherapie¹²¹ oder Chemotherapeutika¹³⁰. Im Hinblick auf die Fülle an Studien über PLK-1-Inhibitoren und die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit stellt PLK-1 eine vielversprechende Zielstruktur für die siRNA-basierte Therapie des HCC dar.

4.7 ppp-siRNA-Technologie

Nachdem sich die RIG-I-vermittelte Immunaktivierung und Zelltodinduktion in den HCC-Zellen als erfolgsversprechendes Therapiekonzept zeigte, sollte dieses Konzept zur Effektsteigerung mit der RNAi-vermittelten Genexpressionshemmung verbunden werden. Neue ppp-siRNA Strategien bieten den Vorteil dieser Kombination. Einer dieser Vorteile ist, dass das Zielgen individuell an das Tumorgewebe angepasst werden kann. Darüber hinaus lassen sich siRNA gegen verschiedene Zielstrukturen kombinieren, um einen synergistischen Effekt bezüglich Zelltodinduktion, Proliferationshemmung, Anti-Angiogenese, Alterierung von Tumormetabolismus oder Aufhebung der Immunsuppression zu erlangen.⁷³

Dieser Ansatz wurde bereits erfolgreich im murinen Melanommodell angewandt, wobei Bcl-2 als Ziel der RNAi-vermittelten Genexpressionshemmung gewählt wurde.⁷² Unsere Arbeitsgruppe erzielte Erfolge in der Behandlung des murinen Pankreaskarzinoms mit einem bifunktionellen 5'ppp-TGF β Molekül.^{86, 73} In dieser Arbeit wurde die Kombination von

ppp-RNA und PLK-1 siRNA in HCC-Zellen evaluiert. Es wurde ein additiver Effekt bezüglich Zelltod, sowie ein immunstimulatorischer Effekt beobachtet. Das Wirkprinzip ist schematisch in Abbildung 23 dargestellt.

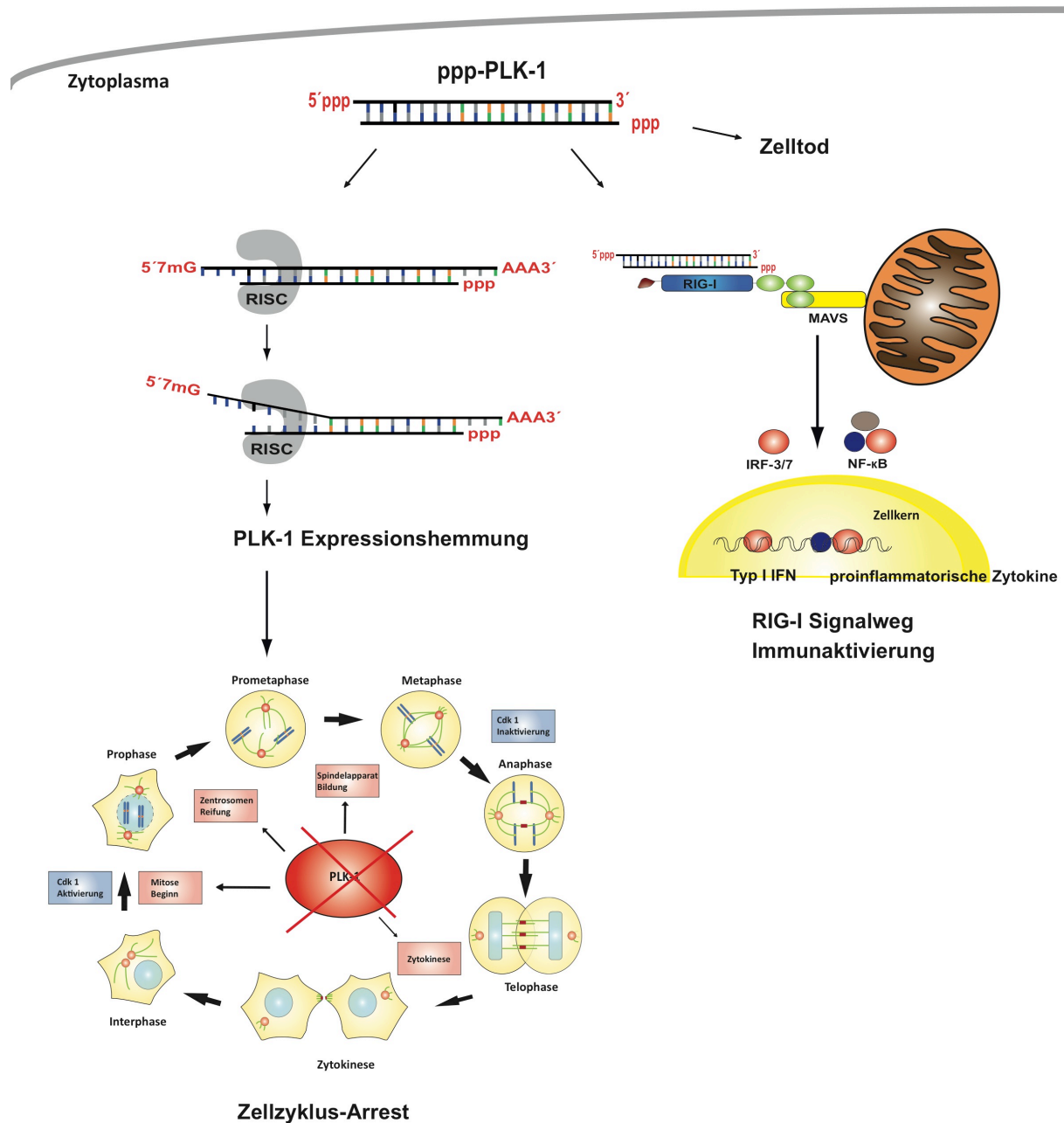


Abbildung 23: Eine 5'ppp-siRNA gegen PLK-1 kombiniert das Potential der RNAi-vermittelten Expressionshemmung von PLK-1 mit der Aktivierung von RIG-I. Die Aktivierung von RIG-I führt zur Sekretion von Typ I IFN und anderen proinflammatorischen Zytokinen und löst in Tumorzellen Zelltod aus. Gleichzeitig induziert die RNAi-vermittelte Hemmung von PLK-1 in Tumorzellen effektiv einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase.

Weitere Fortschritte sind auf dem Gebiet des zielgenauen Transports der siRNA zum Tumor zu erwarten, so dass diese selektiv von den malignen Zellen aufgenommen wird, ohne auf das umgebende Gewebe toxisch zu wirken. Bei intravenöser Injektion würde die siRNA schnell durch die renale Ausscheidung sowie ubiquitären RNAsen eliminiert werden. Daher ist es erforderlich, die RNA in Partikel zu verpacken, deren molekulares Gewicht die Obergrenze der renalen Filtration überschreitet. Eine weitere Hürde stellt die Aufnahme der siRNA ins Zellinnere und die anschließende Freigabe aus dem Endosom ins Zytosol dar, wo die RNAi-Maschinerie der Zelle sitzt. Die verschiedensten Transportmöglichkeiten wurden bisher untersucht, wie multifunktionale polyionkomplexe Mizellen, Nanopartikel aus Lipiden oder speziell für die Leber geschaffene synthetische Vektoren.¹³¹ Außerdem wurden Adenoviren als Vektoren verwendet. In Studien konnte ein erfolgreiches *gene silencing* durch siRNA, die mit Hilfe von Adenoviren transportiert wurde, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden.¹³² Bei rekombinanten Adenoviren muss jedoch die Gefahr der Mutagenese berücksichtigt werden, was durch falsches Integrieren des Vektors in das Zielgenom zu fatalen Mutationen führen kann.¹³³ Eine andere Arbeit nutzt an Vitamin E-gekoppelte Nanopartikel, um siRNA in Hepatozyten zu schleusen.¹³⁴ In der vorliegenden Arbeit wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX verwendet, welches sich in unserer Arbeitsgruppe bei *in vitro* Versuchen erfolgreich bewährt hat.^{110, 113} Tatsächlich könnte zukünftig über andere Trägersubstanzen nachgedacht werden, wie beispielsweise Aptamere, die an Peptidkomplexe gekoppelt sind, um die Effektivität der Transfektion noch weiter zu steigern.¹³⁵

4.8 Immuntherapie des HCC

Die klinische Erfahrung hat gezeigt, dass anti-angiogenetische Agenzien, wie Sorafenib oder neuere Kinase-Inhibitoren, einen eingeschränkten therapeutischen Nutzen haben, obwohl Gefäßneubildung ein charakteristisches Merkmal des HCC ist. In den letzten Jahren gab es große Fortschritte im Bereich der Immuntherapie des HCC, welche ermutigen in diesem Gebiet weiter zu forschen. Gerade das HCC ist möglicherweise besonders geeignet für die Immuntherapie. Hierfür sprechen Berichte, die eine spontane Tumorrückbildung bei einzelnen Patienten beschrieben.¹³⁶ Zudem konnte mit einer IFN- α basierten Therapie bei Patienten ein Therapieansprechen demonstriert werden. Eine Phase II Studie beschrieb Erfolge für die adoptive Immuntherapie, bei der 35 HCC-Patienten mit Tumorlysat-

vorbehandelten DC therapiert wurden. Bei den Patienten konnte eine adäquate Immunantwort nachgewiesen werden und das mediane Überleben aller Patienten lag bei 168 Tagen.¹³⁷

Hinzu kommt, dass das Immunsystem eine entscheidende Rolle in der Entwicklung chronischer Lebererkrankungen und der Karzinogenese des HCC hat. Es wurde nachgewiesen, dass regulatorische T-Zellen im HCC-Gewebe gehäuft vorkommen und mit einer schlechteren Prognose korrelieren.^{138, 139} Auch myeloide Suppressorzellen, die immunsuppressiv wirken, wurden gehäuft in Patienten mit HCC gefunden.¹⁴⁰ Dies macht den Tumor für eine Immuntherapie, die via RIG-I Typ I IFN induziert, besonders attraktiv.

Für das HCC sind minimalinvasive Therapierformen erfolgreich etabliert, die als geeignete Kombinationspartner für Immuntherapeutika genutzt werden könnten. Eine Studie beschreibt wie die Radiofrequenzablation mit verschiedenen Immuntherapeutika kombiniert wurde, dass durch RFA selbst schwache tumorspezifische Immunantworten ausgelöst wurden und RFA mit dem geeigneten Kombinationstherapeutikum die Zukunft der HCC-Therapie sein könnte.³⁷ Eine Metaanalyse untersuchte 19 verschiedene HCC-Studien in denen verschiedene minimalinvasive Therapieformen wie TACE oder RFA mit adoptiver Immuntherapie kombiniert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie im Vergleich zu minimalinvasiven Monotherapien über kurze Zeit wirksamer ist und das Gesamtüberleben von 12 und 24 Monaten der Patienten signifikant steigerte ($P < 0.05$).¹⁴¹

Zudem handelt es sich beim HCC um einen sehr aggressiv-wachsenden Tumor mit schneller Zellteilungsrate. Genau dies stellt den Angriffspunkt für die Hemmung von PLK-1 dar. Hinzu kommt, dass eine Überexpression von PLK-1 im HCC mit einer schlechteren Prognose korreliert.^{88, 93, 94} Die Vorteile, die das HCC als solider Tumor für die Anwendung der siRNA mit sich bringt wurden bereits erläutert. Die Versuche dieser Arbeit legen eine wichtige Grundlage dafür, dass die RIG-I-basierte Immuntherapie in Kombination mit PLK-1-Hemmung beim HCC als Therapieoption in Zukunft weiter untersucht werden sollte.

4.9 Limitation der Arbeit und klinische Relevanz

4.9.1 Limitation der Arbeit

Die Auswirkungen der Therapie mit RLH-Liganden und der Genexpressionshemmung durch siRNA wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich *in vitro* evaluiert. Hierin liegt die Limitation dieser Arbeit. Für die weitere therapeutische Anwendung der Substanzen sind bestätigende Experimente an Tiermodellen erforderlich.

Richtungsweisende *in vivo*-Daten bezüglich der Anwendung eines bifunktionellen siRNA Moleküls, das die Aktivierung von RIG-I mit der Expressionshemmung eines bestimmten Gens kombiniert, wurden von Poeck et al. publiziert. Die Studie beschreibt anhand eines murinen Melanommodells, wie der Einsatz einer Bcl2-gerichteten ppp-siRNA zur vermehrten Induktion von Apoptose in pulmonalen Metastasen und zu einer NK-Zell-abhängigen Immunantwort gegen den Tumor führt.⁷² Die Arbeit von Ellermeier et al. untersuchte eine gegen TGF β 1 gerichtete ppp-siRNA im murinen Pankreaskarzinommodell und konnte deutliche Therapieeffekte beobachten und zeigen, dass die Immunantwort durch CD8⁺ T-Zellen ausgelöst wurde.⁸⁶ In noch unpublizierten Daten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass auch im orthotopen, syngen HCC-Modell durch ppp-RNA eine Überlebensverlängerung erzielt werden kann. Ferner zeigte sich eine systemische und intratumorale INF-getragene Immunantwort. Auch hier war der Therapieeffekt abhängig von Immunzellen, insbesondere CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen. Durch Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren, wie anti-PD-1 Antikörper, konnte die Effektivität sogar noch deutlich gesteigert werden (Posselt et al., Manuskript in Vorbereitung). Diese Versuche demonstrieren eindrücklich, dass Kombinationstherapien einfachen Therapien überlegen sind. Durch die zusätzliche Inhibition von PLK-1 durch eine bifunktionelle ppp-siRNA könnte die Effektivität noch weiter gesteigert werden, was Gegenstand aktueller Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist. Zudem kommen weitere Kombinationstherapien, z.B. mit zytotoxischen Medikamenten, die einen immunogenen Tumorzelltod auslösen, oder stereotaktischer Bestrahlung in Frage. Letztlich sind zur weiteren Optimierung der Therapiestrategien neben orthotopen Tumormodellen genetische Mausmodelle von Vorteil, da diese die Tumorbilogie besser widerspiegeln.

4.9.2 Klinische Relevanz

Ziel dieser Arbeit war es, einen Teil zur Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten beim HCC beizutragen. Die gewonnen Erkenntnisse dieser Arbeit können als Basis für die weitere präklinische Forschung der RLH-basierten Therapie des HCC genutzt werden. Diese Arbeit konnte einerseits RIG-I als Zielstruktur für die Immuntherapie des HCC validieren und andererseits die Grundlage für die Entwicklung bifunktioneller ppp-siRNA gegen PLK-1 bilden, da zumindest *in vitro* synergistische Effekte bezüglich Tumorzelltod zu beobachten waren. Ein entscheidender Vorteil der Therapie mit RLH-Liganden liegt darin, dass im Gegensatz zur Therapie mit zytotoxischen Substanzen, selektiv in Krebszellen Zelltod induziert wird und somit nur geringe systemische Nebenwirkungen zu erwarten sind. Im Mausmodell des Pankreaskarzinoms ließ sich keine Organtoxizität durch ppp-siRNA nachweisen und auch eine transiente Leukopenie war nach 48 Stunden reversibel. Dies lässt darauf schließen, dass RLH-Liganden keine bleibenden Knochenmarksschäden verursachen.⁸⁶ Im Hinblick auf eine Patientenselektion wären prädiktive Marker wünschenswert, die einen Therapieerfolg voraussagen können. Dies ist vor allem relevant, wenn man bedenkt, dass das HCC ein besonders heterogener Tumor ist. Die Arbeit von Hou et al. liefert hierfür wichtige Erkenntnisse¹⁴² und so könnten Patienten mit hoher RIG-I-Expression gezielt für die RLH-Therapie ausgewählt werden. Außerdem könnten die Tumorzellen bezüglich ihrer Expression von PLK-1 individuell charakterisiert und so ein mögliches Ansprechen auf die Therapie mit PLK-1 spezifischer ppp-siRNA vorhergesagt werden. Zusätzlich sollte darüber nachgedacht werden, durch geeignete Kombinationspartner den therapeutischen Effekt der ppp-siRNA zu steigern.

Gerade bei schwer therapierbaren Karzinomen, wie dem HCC, ließen sich die Erfolge etablierter Therapien, wie die Radiofrequenzablation, transarterielle Chemoembolisation, IFN- α oder Sorafenib durch die Zugabe einer ppp-siRNA Therapie möglicherweise erhöhen. So gibt es zahlreiche Studien, die herkömmliche Therapieverfahren des HCC mit Immuntherapeutika verbinden, wie beispielsweise die Kombination aus verschiedenen Ablationsverfahren, wie Kryotherapie, Mikrowellen oder Radiofrequenzablation mit adoptiver Immunzelltherapie.¹⁴³ Vielversprechende Ergebnisse konnten auch durch den Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren erzielt werden. So zeigte eine klinische Studie an 21 HCC-Patienten verursacht durch chronische Virushepatitis C, die mit dem CTLA-4 Antikörper Tremelimumab behandelt wurden, ein medianes Gesamtüberleben von 8,2

Monaten und einen signifikanten Rückgang der Viruslast. Dies zeigt, dass die Blockade von CTLA-4 zusätzlich zur antitumoralen auch eine antivirale Wirkung hat.³⁴ Im Mai 2015 wurden die ersten Ergebnisse der Phase I/II Studie veröffentlicht, bei der 47 Patienten mit fortgeschrittenem HCC mit dem anti-PD1 Antikörper Nivolumab behandelt wurden. Die Untersuchungen zeigten, dass die Überlebensrate nach 12 Monaten noch bei 62% lag. Bei 19% (n=8) der behandelten Patienten zeigte sich ein erhöhtes Ansprechen auf die Therapie. Bei 67% (n=28) der Patienten zeigte die Krankheit kein Fortschreiten oder Ansprechen auf die Therapie, während bei 33% (n=14) die Tumore trotz Therapie weiter voranschritten. Bei zwei Patienten konnte sogar nach einer Therapiedauer von nur 3 Monaten von einer kompletten Remission gesprochen werden, die für 12-18 Monate oder länger bestehen blieb.¹⁰¹ Aktuell gibt es auch Berichte die eine Tumorremission von metastasiertem HCC nach Pembrolizumab Therapie beschreiben.¹⁴⁴ Auch die Kombination aus Tremelimumab mit TACE oder Ablation zeigten in einer Phase I Studie vielversprechende Ergebnisse.¹⁴⁵ Des Weiteren hat die Firma Rigontec begonnen RIG-I mit Hilfe von synthetischen Liganden zu aktivieren und plant bis Ende 2017 die erste klinische Anwendung von 5'ppp-RNA (www.rigontec.com). Bei guter Verträglichkeit in Phase I Studien könnten somit RIG-I-Liganden für klinische Studien zugänglich werden.

5. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine aggressive Krebserkrankung mit schlechter Prognose. Die Erforschung neuer Therapieansätze ist daher dringend erforderlich. Immuntherapeutische Ansätze geben Hoffnung, das derzeitige Therapie-Arsenal bestehend aus Operation, interventioneller Tumorabletion, Chemotherapie und zielgerichteten Therapeutika, erweitern zu können. Erste Ergebnisse mit Immuncheckpoint-Inhibitoren geben Hinweise, dass durch das Immunsystem eine Tumorstumskontrolle im HCC erzielt werden kann.¹⁰¹

Die vorliegende Arbeit konnte die zytosolische Helikase RIG-I als Zielstruktur für die Immuntherapie des HCC in humanen und murinen Tumorzellen erfolgreich validieren. 100% der 179 untersuchten humanen HCC-Gewebeproben zeigten eine mehr oder weniger stark ausgeprägte RIG-I-Expression in der Immunhistochemie. Als synthetischer Ligand von RIG-I wurde zur Überprüfung der Funktionalität des RIG-I-Signalwegs in den Tumorzellen eine am 5'-Ende modifizierte *in vitro*-transkribierte ppp-RNA generiert. Neben einer antiviralen IFN-vermittelten Immunantwort löste die Aktivierung von RIG-I auch Zelltod in HCC-Zellen aus.

Da 5'ppp-RNA-vermittelte RIG-I-Aktivierung prinzipiell mit siRNA-vermittelter Genexpressionshemmung tumorfördernder Gene kombiniert werden kann (sog. bifunktionelle 5'ppp-siRNA) und der Zellzyklusregulator PLK-1 in HCC häufig überexprimiert ist, wurde zudem der Effekt einer siRNA gegen PLK-1 auf die Tumorzellen analysiert. Die RNAi-vermittelte Hemmung von PLK-1 induzierte in humanen und murinen HCC-Zelllinien effektiv einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase, wobei der Effekt bei der humanen Hep3B stärker als bei der murinen Hepa 1-6 Zelllinie ausgeprägt war. Die Kombination aus beiden Ansätzen mittels 5'ppp-RNA und PLK-1 siRNA führte bei HCC-Zellen additiv zu Zelltod. Zusätzlich fand sich eine potente CXCL10 Sekretion als Hinweis auf eine IFN-getragene Immunantwort.

Eine Immuntherapie mit bifunktioneller 5'ppp-siRNA gegen PLK-1 stellt somit einen vielversprechenden innovativen Therapieansatz für das HCC dar. Diese Arbeit lieferte die Grundlage für aktuelle Experimente der Arbeitsgruppe, in denen eine neu generierte ppp-siRNA gegen PLK-1 *in vivo* im orthotopen Maustumormodell untersucht wird.

6. Literaturverzeichnis

1. Fatourou EM, Koskinas JS. Adaptive immunity in hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009, 9(10): 1499-1510.
2. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol* 2002, 35(5 Suppl 2): S72-78.
3. Alazawi W, Cunningham M, Dearden J, Foster GR. Systematic review: outcome of compensated cirrhosis due to chronic hepatitis C infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2010, 32(3): 344-355.
4. Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut* 2014, 63(5):844-55.
5. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011, 365(12): 1118-1127.
6. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997, 349(9061): 1269-1276.
7. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006, 6(9): 674-687.
8. Feo F, Frau M, Tomasi ML, Brozzetti S, Pascale RM. Genetic and epigenetic control of molecular alterations in hepatocellular carcinoma. *Exp Biol Med* 2009, 234(7): 726-736.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5): 646-674.
10. Maass T, Sfakianakis I, Staib F, Krupp M, Galle PR, Teufel A. Microarray-based gene expression analysis of hepatocellular carcinoma. *Curr Genomics* 2010, 11(4): 261-268.
11. Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, *et al.* High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet* 2011, 43(5): 464-469.
12. Saeki A, Tamura S, Ito N, Kiso S, Matsuda Y, Yabuuchi I, *et al.* Frequent impairment of the spindle assembly checkpoint in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002, 94(7): 2047-2054.
13. Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002, 27(1): 63-68.
14. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, *et al.* Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001, 61(11): 4365-4370.

15. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010, 29(36): 4989-5005.
16. Haybaeck J, Zeller N, Wolf MJ, Weber A, Wagner U, Kurrer MO, *et al.* A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2009, 16(4): 295-308.
17. Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars Immunol* 2014, 26(1): 54-74.
18. He G, Karin M. NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res* 2011, 21(1): 159-168.
19. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011, 331(6024): 1565-1570.
20. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008, 359(4): 378-390.
21. Miamen AG, Dong H, Roberts LR. Immunotherapeutic approaches to hepatocellular carcinoma treatment. *Liver Cancer* 2012, 1(3-4): 226-237.
22. Pardee AD, Butterfield LH. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma: Unique challenges and clinical opportunities. *Oncoimmunology* 2012, 1(1): 48-55.
23. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008, 134(6): 1752-1763.
24. Greten TF, Wang XW, Korangy F. Current concepts of immune based treatments for patients with HCC: from basic science to novel treatment approaches. *Gut* 2015, 64(5): 842-848.
25. Llovet JM, Sala M, Castells L, Suarez Y, Vilana R, Bianchi L, *et al.* Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000, 31(1): 54-58.
26. Chen LT, Chen MF, Li LA, Lee PH, Jeng LB, Lin DY, *et al.* Long-term results of a randomized, observation-controlled, phase III trial of adjuvant interferon Alfa-2b in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Ann Surg* 2012, 255(1): 8-17.
27. Prieto J, Melero I, Sangro B. Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015, 12(12): 681-700.
28. Sawada Y, Yoshikawa T, Nobuoka D, Shirakawa H, Kuronuma T, Motomura Y, *et al.* Phase I trial of a glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma: immunologic evidence and potential for improving overall survival. *Clin Cancer Res* 2012, 18(13): 3686-3696.
29. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014, 515(7528): 568-571.

30. Sangro B, Prieto J. Gene therapy for liver cancer: clinical experience and future prospects. *Curr Opin Mol Ther* 2010, 12(5): 561-569.
31. Makarova-Rusher OV, Medina-Echeverez J, Duffy AG, Greten TF. The yin and yang of evasion and immune activation in HCC. *J Hepatol* 2015, 62(6): 1420-1429.
32. Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, *et al.* Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2000, 356(9232): 802-807.
33. Shimizu K, Kotera Y, Aruga A, Takeshita N, Katagiri S, Ariizumi S, *et al.* Postoperative dendritic cell vaccine plus activated T-cell transfer improves the survival of patients with invasive hepatocellular carcinoma. *Hum Vaccin Immunother* 2014, 10(4): 970-976.
34. Sangro B, Gomez-Martin C, de la Mata M, Inarrairaegui M, Garraalda E, Barrera P, *et al.* A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2013, 59(1): 81-88.
35. Harding JJ, El Dika I, Abou-Alfa GK. Immunotherapy in hepatocellular carcinoma: Primed to make a difference? *Cancer* 2015.
36. Heo J, Reid T, Ruo L, Breitbach CJ, Rose S, Bloomston M, *et al.* Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med* 2013, 19(3): 329-336.
37. Li G, Staveley-O'Carroll KF, Kimchi ET. Potential of radiofrequency ablation in combination with immunotherapy in the treatment of hepatocellular carcinoma. *J Clin Trials* 2016, 6(2).
38. Hou J, Zhou Y, Zheng Y, Fan J, Zhou W, Ng IO, *et al.* Hepatic RIG-I Predicts Survival and Interferon-alpha Therapeutic Response in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* 2014, 25(1): 49-63.
39. Janeway CA, Jr. Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold spring harb symp quant biol. 1989. 54: 1-13. *J Immunol* 2013, 191(9): 4475-4487.
40. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010, 140(6): 805-820.
41. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, 124(4): 783-801.
42. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, *et al.* Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 2008, 9(7): 769-776.
43. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006, 7(2): 131-137.

44. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009, 9(7): 465-479.
45. Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* 2009, 4: 365-398.
46. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009, 21(4): 317-337.
47. Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* 2008, 20(1): 17-22.
48. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004, 5(7): 730-737.
49. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, *et al.* The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 2005, 175(8): 5260-5268.
50. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006, 314(5801): 994-997.
51. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006, 314(5801): 997-1001.
52. Schmidt A, Schwerd T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, *et al.* 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(29): 12067-12072.
53. Goldeck M, Schlee M, Hartmann G, Hornung V. Enzymatic synthesis and purification of a defined RIG-I ligand. *Methods Mol Biol* 2014, 1169: 15-25.
54. Cui S, Eisenacher K, Kirchhofer A, Brzozka K, Lammens A, Lammens K, *et al.* The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell* 2008, 29(2): 169-179.
55. Takahasi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, *et al.* Nonspecific RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* 2008, 29(4): 428-440.
56. Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* 2009, 227(1): 54-65.
57. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, *et al.* Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(22): 8459-8464.

58. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008, 1143: 1-20.
59. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, *et al.* LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(4): 1512-1517.
60. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005, 437(7062): 1167-1172.
61. Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, *et al.* Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol* 2010, 11(1): 63-69.
62. Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, *et al.* Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* 2010, 59(9): 1192-1199.
63. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010, 464(7293): 1357-1361.
64. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006, 441(7089): 101-105.
65. Anz D, Koelzer VH, Moder S, Thaler R, Schwerd T, Lahl K, *et al.* Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells. *J Immunol* 2010, 184(2): 939-946.
66. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957, 147(927): 258-267.
67. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity* 2006, 25(3): 373-381.
68. Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res* 2005, 15(6): 407-422.
69. Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, *et al.* A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* 2005, 6(7): 722-729.
70. Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Hacker G, Berking C, *et al.* Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* 2009, 119(8): 2399-2411.
71. Tormo D, Checinska A, Alonso-Curbelo D, Perez-Guijarro E, Canon E, Riveiro-Falkenbach E, *et al.* Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* 2009, 16(2): 103-114.

72. Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, *et al.* 5'-triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med* 2008, 14(11): 1256-1263.
73. Schnurr M, Duewell P. Breaking tumor-induced immunosuppression with 5'-triphosphate siRNA silencing TGFbeta and activating RIG-I. *Oncoimmunology* 2013, 2(5): e24170.
74. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 2013, 31: 51-72.
75. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol* 2011, 8(3): 151-160.
76. West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011, 13(6): R126.
77. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001, 409(6818): 363-366.
78. Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 2009, 457(7228): 396-404.
79. Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2008, 9(1): 22-32.
80. Davidson BL, McCray PB, Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet* 2011, 12(5): 329-340.
81. Boudreau RL, Davidson BL. Generation of hairpin-based RNAi vectors for biological and therapeutic application. *Methods Enzymol* 2012, 507: 275-296.
82. Sehgal A, Vaishnaw A, Fitzgerald K. Liver as a target for oligonucleotide therapeutics. *J Hepatol* 2013, 59(6): 1354-1359.
83. Judge AD, Robbins M, Tavakoli I, Levi J, Hu L, Fronda A, *et al.* Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J Clin Invest* 2009, 119(3): 661-673.
84. Li H, Fu X, Chen Y, Hong Y, Tan Y, Cao H, *et al.* Use of adenovirus-delivered siRNA to target oncoprotein p28GANK in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2005, 128(7): 2029-2041.
85. Salvi A, Arici B, De Petro G, Barlati S. Small interfering RNA urokinase silencing inhibits invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004, 3(6): 671-678.

86. Ellermeier J, Wei J, Duewell P, Hoves S, Stieg MR, Adunka T, *et al.* Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2013, 73(6): 1709-1720.
87. Clay FJ, McEwen SJ, Bertoncello I, Wilks AF, Dunn AR. Identification and cloning of a protein kinase-encoding mouse gene, Plk, related to the polo gene of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(11): 4882-4886.
88. Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006, 6(4): 321-330.
89. Mundt KE, Golsteyn RM, Lane HA, Nigg EA. On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (PLK1): effects of overexpression on cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 239(2): 377-385.
90. Guan R, Tapang P, Levenson JD, Albert D, Giranda VL, Luo Y. Small interfering RNA-mediated Polo-like kinase 1 depletion preferentially reduces the survival of p53-defective, oncogenic transformed cells and inhibits tumor growth in animals. *Cancer Res* 2005, 65(7): 2698-2704.
91. Schmit TL, Zhong W, Nihal M, Ahmad N. Polo-like kinase 1 (Plk1) in non-melanoma skin cancers. *Cell Cycle* 2009, 8(17): 2697-2702.
92. Spankuch B, Kurunci-Csacsko E, Kaufmann M, Strebhardt K. Rational combinations of siRNAs targeting Plk1 with breast cancer drugs. *Oncogene* 2007, 26(39): 5793-5807.
93. Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, Ehemann V, Staniscia T, Evert M, *et al.* Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010, 51(3): 857-868.
94. He ZL, Zheng H, Lin H, Miao XY, Zhong DW. Overexpression of polo-like kinase1 predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2009, 15(33): 4177-4182.
95. Degenhardt Y, Lampkin T. Targeting Polo-like kinase in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2010, 16(2): 384-389.
96. Sun W, Su Q, Cao X, Shang B, Chen A, Yin H, *et al.* High expression of polo-like kinase 1 is associated with early development of hepatocellular carcinoma. *Int J Genomics* 2014, 2014: 312130.
97. Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, *et al.* Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 2002, 13(6): 1929-1939.
98. Studach LL, Rakotomalala L, Wang WH, Hullinger RL, Cairo S, Buendia MA, *et al.* Polo-like kinase 1 inhibition suppresses hepatitis B virus X protein-induced transformation in an in vitro model of liver cancer progression. *Hepatology* 2009, 50(2): 414-423.

99. Andrisani OM, Studach L, Merle P. Gene signatures in hepatocellular carcinoma (HCC). *Semin Cancer Biol* 2011, 21(1): 4-9.
100. Zuhorn IS, Kalicharan R, Hoekstra D. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J Biol Chem* 2002, 277(20): 18021-18028.
101. Kudo M. Immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer* 2015, 4(4): 201-207.
102. Schmidt A, Rothenfusser S, Hopfner KP. Sensing of viral nucleic acids by RIG-I: from translocation to translation. *Eur J Cell Biol* 2012, 91(1): 78-85.
103. Zoglmeier C, Bauer H, Norenberg D, Wedekind G, Bittner P, Sandholzer N, *et al.* CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res* 2011, 17(7): 1765-1775.
104. Pace L, Vitale S, Dettori B, Palombi C, La Sorsa V, Belardelli F, *et al.* APC activation by IFN-alpha decreases regulatory T cell and enhances Th cell functions. *J Immunol* 2010, 184(11): 5969-5979.
105. Kubler K, Gehrke N, Riemann S, Bohnert V, Zillinger T, Hartmann E, *et al.* Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2010, 70(13): 5293-5304.
106. Meng G, Xia M, Xu C, Yuan D, Schnurr M, Wei J. Multifunctional antitumor molecule 5'-triphosphate siRNA combining glutaminase silencing and RIG-I activation. *Int J Cancer* 2014, 134(8): 1958-1971.
107. Liu Z, Dou C, Jia Y, Li Q, Zheng X, Yao Y, *et al.* RIG-I suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by regulating MMP9. *Int J Oncol* 2015, 46(4): 1710-1720.
108. Kubler K, tho Pesch C, Gehrke N, Riemann S, Dassler J, Coch C, *et al.* Immunogenic cell death of human ovarian cancer cells induced by cytosolic poly(I:C) leads to myeloid cell maturation and activates NK cells. *Eur J Immunol* 2011, 41(10): 3028-3039.
109. Chen X, Qian Y, Yan F, Tu J, Yang X, Xing Y, *et al.* 5'-triphosphate-siRNA activates RIG-I-dependent type I interferon production and enhances inhibition of hepatitis B virus replication in HepG2.2.15 cells. *Eur J Pharmacol* 2013, 721(1-3): 86-95.
110. Duewell P, Beller E, Kirchleitner SV, Adunka T, Bourhis H, Siveke J, *et al.* Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma. *Oncoimmunology* 2015, 4(10): e1029698.
111. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 2002, 168(7): 3195-3204.

112. Chew V, Chen J, Lee D, Loh E, Lee J, Lim KH, *et al.* Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. *Gut* 2012, 61(3): 427-438.
113. Duewell P, Steger A, Lohr H, Bourhis H, Hoelz H, Kirchleitner SV, *et al.* RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8(+) T cells. *Cell Death Differ* 2014, 21(12): 1825-1837.
114. Schnurr M, Duewell P. Induction of immunogenic cell death by targeting RIG-I-like helicases in pancreatic cancer. *Oncoimmunology* 2014, 3(9): e955687.
115. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391(6669): 806-811.
116. Dharmapuri S, Peruzzi D, Marra E, Palombo F, Bett AJ, Bartz SR, *et al.* Intratumor RNA interference of cell cycle genes slows down tumor progression. *Gene Ther* 2011, 18(7): 727-733.
117. Cervantes A, Alsina M, Tabernero J, Infante JR, LoRusso P, Shapiro G, *et al.* Phase I dose-escalation study of ALN-VSP02, a novel RNAi therapeutic for solid tumors with liver involvement. *J Clin Oncol* 2011, 29(15_suppl): 3025.
118. Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, *et al.* Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 2010, 464(7291): 1067-1070.
119. Deng H, Jiang Q, Yang Y, Zhang S, Ma Y, Xie G, *et al.* Intravenous liposomal delivery of the short hairpin RNAs against Plk1 controls the growth of established human hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2011, 11(4): 401-409.
120. Yu C, Zhang X, Sun G, Guo X, Li H, You Y, *et al.* RNA interference-mediated silencing of the polo-like kinase 1 gene enhances chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma cells. *J Cell Mol Med* 2008, 12(6A): 2334-2349.
121. Chen JL, Chen JP, Huang YS, Tsai YC, Tsai MH, Jaw FS, *et al.* Radiosensitization in esophageal squamous cell carcinoma : effect of polo-like kinase 1 inhibition. *Strahlenther Onkol* 2016, 192(4): 260-268.
122. Wang ZX, Xue D, Liu ZL, Lu BB, Bian HB, Pan X, *et al.* Overexpression of polo-like kinase 1 and its clinical significance in human non-small cell lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2012, 44(1): 200-210.
123. Feng YB, Lin DC, Shi ZZ, Wang XC, Shen XM, Zhang Y, *et al.* Overexpression of PLK1 is associated with poor survival by inhibiting apoptosis via enhancement of survivin level in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2009, 124(3): 578-588.
124. Ferrarotto R, Goonatilake R, Young Yoo S, Tong P, Giri U, Peng S, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition predicts Polo-like Kinase 1 Inhibitor-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2016, 22(7): 1674-1686.

125. Li J, Wang R, Schweickert PG, Karki A, Yang Y, Kong Y, *et al.* Plk1 inhibition enhances the efficacy of gemcitabine in human pancreatic cancer. *Cell Cycle* 2016, 15(5): 711-719.
126. Zhao CL, Ju JY, Gao W, Yu WJ, Gao ZQ, Li WT. Downregulation of PLK1 by RNAi attenuates the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma cells via promoting apoptosis and inhibiting angiogenesis. *Neoplasma* 2015, 62(5): 748-755.
127. Gjertsen BT, Schoffski P. Discovery and development of the Polo-like kinase inhibitor volasertib in cancer therapy. *Leukemia* 2015, 29(1): 11-19.
128. de Braud F, Cascinu S, Spitaleri G, Pilz K, Clementi L, Liu D, *et al.* A phase I, dose-escalation study of volasertib combined with nintedanib in advanced solid tumors. *Ann Oncol* 2015, 26(11): 2341-2346.
129. Nokihara H, Yamada Y, Fujiwara Y, Yamamoto N, Wakui H, Nakamichi S, *et al.* Phase I trial of volasertib, a Polo-like kinase inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 2016, 34(1): 66-74.
130. Brassesco MS, Pezuk JA, Morales AG, de Oliveira JC, Roberto GM, da Silva GN, *et al.* In vitro targeting of Polo-like kinase 1 in bladder carcinoma: comparative effects of four potent inhibitors. *Cancer Biol Ther* 2013, 14(7): 648-657.
131. Peer D, Howard KA. RNA interference-based therapeutics and diagnostics. *Drug Deliv Transl Res* 2014, 4(1): 1-2.
132. Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 2002, 20(10): 1006-1010.
133. Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, *et al.* Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002, 296(5567): 497.
134. Duan L, Yan Y, Liu J, Wang B, Li P, Hu Q, *et al.* Target delivery of small interfering RNAs with vitamin E-coupled nanoparticles for treating hepatitis C. *Sci Rep* 2016, 6: 24867.
135. Diao Y, Liu J, Ma Y, Su M, Zhang H, Hao X. A specific aptamer-cell penetrating peptides complex delivered siRNA efficiently and suppressed prostate tumor growth in vivo. *Cancer Biol Ther* 2016: 1-9.
136. Oquinena S, Guillen-Grima F, Inarrairaegui M, Zozaya JM, Sangro B. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009, 21(3): 254-257.
137. Palmer DH, Midgley RS, Mirza N, Torr EE, Ahmed F, Steele JC, *et al.* A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009, 49(1): 124-132.

138. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005, 65(6): 2457-2464.
139. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, *et al.* Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007, 25(18): 2586-2593.
140. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Kruger C, Manns MP, *et al.* A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 2008, 135(1): 234-243.
141. Ding M, Wang Y, Chi J, Wang T, Tang X, Cui D, *et al.* Is adjuvant cellular immunotherapy essential after TACE-predominant minimally-invasive treatment for hepatocellular carcinoma? A systematic Meta-analysis of studies including 1774 patients. *PloS One* 2016, 11(12): e0168798.
142. Hou J, Zhou Y, Zheng Y, Fan J, Zhou W, Ng IO, *et al.* Hepatic RIG-I predicts survival and interferon-alpha therapeutic response in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2013, 25(1):49-63
143. Cui J, Wang N, Zhao H, Jin H, Wang G, Niu C, *et al.* Combination of radiofrequency ablation and sequential cellular immunotherapy improves progression-free survival for patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2014, 134(2): 342-351.
144. Truong P, Rahal A, Kallail KJ. Metastatic hepatocellular carcinoma responsive to Pembrolizumab. *Cureus* 2016, 8(6): e631.
145. Duffy AG, Ulahannan SV, Makorova-Rusher O, Rahma O, Wedemeyer H, Pratt D, *et al.* Tremelimumab in combination with ablation in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016, 66(3):545-551

7. Verzeichnis der Abkürzungen

AFP	Alpha-1-Fetoprotein
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer Classification</i>
<i>Bcl-xl</i>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CDK	Cyclin-abhängigen Kinasen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CTL	zytotoxische T-Zelle (CD8 ⁺)
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4</i>
CLR	C-typ Lecitin Rezeptoren
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i> (Synonym: IP-10)
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DC	dendritische Zelle
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescent-activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
IFN	Interferon
IFNR	IFN Rezeptor
IGF-2	<i>insulin-like growth factor-2</i>
IPS-1	<i>interferon-beta promoter stimulator 1</i> (Syn.: MAVS, VISA, Cardif)
IL	Interleukin

IP-10	<i>interferon gamma-induced protein 10</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated antigen 5</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cell</i>
MD2	myeloid differentiation factor 2
MHC-I	<i>major histocompatibility complex I</i>
miRNA	micro RNA
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modifier</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK	natürliche Killerzelle
NLR	<i>nod-like receptor</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
Opti-MEM [®]	<i>minimal essential medium</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed cell death-1</i>
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PLK-1	Polo-like Kinase 1
poly(I:C)	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
ppp-RNA	5'-Triphosphat modifizierte RNA
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time-polymerase chain reaction</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLH	RIG-I-like-Helikase
RLR	RIG-I-like-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRADD	<i>TNF-receptor-associated protein with death domain</i>
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

8. Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Max Schnurr für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe *Cancer Vaccine Lab*, das Überlassen des interessanten Doktorarbeitsthemas und die fortwährende Motivation zum wissenschaftlichen Arbeiten. Er war immer offen für neue oder auch fragwürdige Ergebnisse und unterstützte mich stets bei neuen Lösungsansätzen.

Außerdem danke ich Dr. Peter Düwell für die praktische Einarbeitung, die zahlreichen fachlichen sowie methodischen Ratschläge und die fortwährende Unterstützung. Ich danke Dr. Felix Lichtenegger, der mich in meinen ersten Monaten einarbeitete und Dr. Stefanie Schieffenbusch, die meine Experimente am Ende meiner Laborzeit tatkräftig unterstützte. Außerdem danke ich Dr. Lars König, der mir ebenfalls in der Endphase meiner Arbeit half.

Ich möchte mich bei Prof. Stefan Endres für die Aufnahme in die Abteilung für Klinische Pharmakologie bedanken. Als Abteilungsleiter trägt er einen wesentlichen Teil zum effektiven und kollegial hilfsbereiten Arbeitsklima bei. Während meiner Promotion habe ich nicht nur auf wissenschaftlicher, sondern auch menschlicher Ebene enorm viel gelernt und eine tolle Zeit erlebt, die ich nicht missen möchte.

Ebenfalls danke ich meinen Mitdoktoranden, Hannah Lohr, Hannes Hölz und Tina Adunka, sowie allen anderen Mitdoktoranden meines „Jahrgangs“ für die freundschaftliche Zusammenarbeit, das gegenseitige Aushelfen und das einzigartige Arbeitsklima.

Zusätzlich möchte ich mich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 1202 – „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken. Der regelmäßige wissenschaftliche Austausch in Seminaren und *Retreats* hat mir sehr geholfen, mich in das Gebiet der Tumorummunologie einzuarbeiten, mir einen Einblick in verwandte Forschungsgebiete ermöglicht und neue Denkansätze für meine eigene Dissertation vermittelt.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, Ursula und Gerd, für die liebevolle Unterstützung während meines gesamten Studiums und dass sie mich kontinuierlich motivieren konnten.

Eidesstattliche Versicherung

Funk, Anja Nina Lena

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**RIG-I-like-Helikasen als Zielstrukturen für die Immuntherapie des hepatozellulären
Karzinoms mittels bifunktioneller siRNA gegen Polo-like-Kinase 1**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen
sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, 14. März 2018